

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ**

**ΑΝΤΩΝΙΟΥ ΓΕΩΡΓΙΑ
ΧΗΜΙΚΟΣ**

Διδακτορική Διατριβή

**“ Η επίδραση της μηχανικής τάσης στο
πνευμονικό επιθήλιο, στα κύτταρα και στο
κυψελιδικό υγρό των πνευμόνων ”**

στο πλαίσιο του Μέτρου 8.3 του Ε.Π Ανταγωνιστικότητα, Γ' Κοινοτικό

Πλαίσιο Στήριξης και συγχρηματοδοτείται κατά:

- 80% της Δημόσιας Δαπάνης από την Ευρωπαϊκή Ένωση-Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο
- 20% της Δημόσιας Δαπάνης από το Ελληνικό Δημόσιο-Υπουργείο Ανάπτυξης-Γενική Γραμματεία Έρευνας & Τεχνολογίας
- και από τον Ιδιωτικό Τομέα

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2009

*Αφιερώνεται στους γονείς μου,
Νίκο και Μοσχάνθη
και στην αδερφή μου Μυρσίνη*

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΚΑΙ ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Η διδακτορική διατριβή παρουσιάστηκε αρχικά στην τριμελή συμβουλευτική επιτροπή, που αποτελείται από τους :

1. Λέκκα Μαρία-Ελένη, Αναπλ. Καθηγήτρια, Παν/μιο Ιωαννίνων
2. Νάκο Γεώργιο, Καθηγητή, Παν/μιο Ιωαννίνων
3. Καναβάρο Παναγιώτη, Καθηγητή, Παν/μιο Ιωαννίνων

Και στη συνέχεια στην επταμελή επιτροπή που αποτελείται επιπλέον από τους:

4. Αθανασία Σιαφάκα-Καπάδα, Καθηγήτρια, Παν/μιο Αθηνών
5. Μαρία Μπάη, Καθηγήτρια, Παν/μιο Ιωαννίνων
6. Ντία Γαλανοπούλου, Αναπλ. Καθηγήτρια, Παν/μιο Αθηνών,
7. Βασίλειο Κουλούρα, Επικ. Καθηγητή, Παν/μιο Ιωαννίνων

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διδακτορική διατριβή εκπονήθηκε στο εργαστήριο Βιοχημείας του τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων. Το ερευνητικό μέρος της διατριβής πραγματοποιήθηκε υπό την επίβλεψη της Αναπληρώτριας Καθηγήτριας Βιοχημείας του τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων κ. Μαρίας- Ελένης Λέκκα. Το κλινικό μέρος της διατριβής σχεδιάστηκε και υλοποιήθηκε στη Μονάδα Εντατικής Θεραπείας του Περιφερειακού Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ιωαννίνων, υπό την επίβλεψη του διευθυντή της ΜΕΘ και καθηγητή της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, κ. Γεώργιο Νάκο.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω την κ. Λέκκα, όπου είχε την επίβλεψη και την άμεση καθοδήγηση της εργασίας, για την πολύτιμη επιστημονική βοήθεια, για την επιμονή, την ηθική συμπαράσταση και το πραγματικό ενδιαφέρον που έδειξε καθ' όλη την περίοδο εκπόνησης της εργασίας.

Ευχαριστώ επίσης, τον κ. Γεώργιο Νάκο, χωρίς τη βοήθεια του οποίου δεν θα ήταν δυνατή η πραγματοποίηση αυτής της εργασίας. Τον ευχαριστώ για τις πολύτιμες παρατηρήσεις του και το σχεδιασμό της έρευνας, κυρίως στο ιατρικό μέρος της εργασίας.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Παναγιώτη Καναβάρο Καθηγητή της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, μέλος της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής, καθώς και τα υπόλοιπα μέλη της επταμελούς επιτροπής, κ. Αθανασία Σιαφάκα-Καπάδα, Καθηγήτρια Τμ. Χημείας Πανεπιστημίου Αθηνών, κ. Κωνσταντία Γαλανοπούλου, Αναπλ. Καθηγήτρια Τμ. Χημείας Πανεπιστημίου Αθηνών, κ. Μαρία Μπάη, Καθηγήτρια Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων και τον κ. Βασίλειο Κουλούρα, Επικ. Καθηγητή της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων για τις παρατηρήσεις και τα σχόλιά τους.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ στην κ. Θεώνη Τράγκα Αναπληρώτρια Καθηγήτρια του Τμήματος Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, για τις πολύτιμες συμβουλές και παρατηρήσεις της.

Ευχαριστώ ιδιαίτερα τη συνάδελφο κ. Ειρήνη Κητισιούλη για την καθοδήγηση και τις εύστοχες παρατηρήσεις της στα ερευνητικά θέματα, καθώς και τους συναδέλφους Ελίζα Μαρκατζίνου, Θανάση Καρκαμπούνα, Δέσποινα Πανταζή, Ελευθερία Λέτσιου, Νικόλα Σάιμον-Κουσουρή και Γιάννη Γιαννακόπουλο για την ευχάριστη συνεργασία που είχαμε.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την αδερφή μου Μυρσίνη και τους φίλους μου Άγγελο και Σπύρο που με βοήθησαν με τις εξειδικευμένες γνώσεις τους σε θέματα office αλλά και για τη συμπαράσταση τους γενικότερα.

Η μελέτη πραγματοποιήθηκε στα πλαίσια του έργου ΠΕΝΕΔ 2003: « Η επίδραση της μηχανικής αναπνοής και της εφελκυστικής τάσης στο επιθήλιο και στο ενδοθήλιο του πνευμονικού παρεγχύματος. Προληπτική επίδραση της PEEP στις βλάβες τις προκαλούμενες από αναπνευστήρα».

Γεωργία Αντωνίου
Ιούνιος 2009, Ιωάννινα

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΚΑΙ ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ	I
ΠΡΟΛΟΓΟΣ	II
ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ	IV
ΣΚΟΠΟΣ	XI
ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ	XII
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	1
1) ΤΑ ΚΥΤΤΑΡΑ ΤΟΥ ΠΝΕΥΜΟΝΑ	2
1.1 Ανατομία του αναπνευστικού συστήματος	2
1.2 Τα κύτταρα του κυψελιδικού χώρου	5
2) ΣΥΝΔΡΟΜΟ ΟΞΕΙΑΣ ΑΝΑΠΝΕΥΣΤΙΚΗΣ ΔΥΣΧΕΡΕΙΑΣ (ARDS)	8
2.1 Γενικά	8
2.2 Κλινική ταξινόμηση	8
2.3 Αίτια εμφάνισης του ARDS	9
2.4 Μηχανισμοί πρόκλησης της βλάβης	10
2.4.1 Δημιουργία πνευμονικού οιδήματος	10
2.4.2 Ρόλος της τριχοειδοκυψελιδικής μεμβράνης	11
2.4.3 Φλεγμονή στον πνεύμονα	12
3) ΜΗΧΑΝΙΚΟΣ ΑΕΡΙΣΜΟΣ	14
3.1 Γενικά	14

3.2 Μηχανικός αερισμός	14
3.3 Δυνάμεις που ασκούνται στον πνεύμονα	15
3.4 Μηχανικές καταπονήσεις στον πνεύμονα και στα κύτταρα	17
3.5 Μηχανική διάταση	18
3.6 Επίδραση των μηχανικών καταπονήσεων στα κύτταρα του πνεύμονα	19
4) ΦΩΣΦΟΛΙΠΑΣΕΣ A_2	22
4.1 Εισαγωγή	22
4.2 Κατηγορίες φωσφολιπασών A_2	23
4.3 Δράση φωσφολιπασών A_2	25
4.4 Ρύθμιση ενεργοποίησης κυτοσολικής φωσφολιπάσης A_2	27
4.5 Ρύθμιση ενεργοποίησης εκκρινόμενης φωσφολιπάσης A_2	27
4.6 Διασταύρωση εκκρινόμενης και κυτοσολικής φωσφολιπάσης A_2	31
4.7 Φωσφολιπάση A_2 και πνεύμονες	31
5) ΜΑΚΡΟΛΙΔΙΑ	33
5.1 Γενικά	33
5.2 Αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες μακρολιδίων	34
5.2.1 Επίδραση στα επιθηλιακά κύτταρα	35
5.2.2 Επίδραση στην άμυνα του επιθηλίου	36
5.2.3 Επίδραση στις πρωτεΐνες της βλέννας	38
5.2.4 Επίδραση στη μετακίνηση ιόντων	39
5.3 Συνοπτικά	39
ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	42
1. Καλλιέργεια κυττάρων A549 και H441	42

Συσκευές- Υλικά	43
Διαλύματα εργασίας	44
1.2 Καμπύλη ανάπτυξης	45
Συσκευές-Υλικά	46
1.2.1 Μικροσκοπική παρατήρηση- Μέτρηση αριθμού κυττάρων	46
1.2.2 Επεξεργασία αποτελεσμάτων	46
1.3 Καλλιέργειες A549 και H441 εργασίας (working)	46
Υλικά	46
Διαλύματα	47
2. Λήψη και κατεργασία βρογχοκυψελιδικού εκπλύματος (BAL)	48
Υλικά- Συσκευές	48
Διαλύματα εργασίας	48
Πειραματική πορεία	48
2.1 Επίστρωση σε τρυβλία	49
Υλικά	49
Διαλύματα εργασίας	49
Πειραματική πορεία	50
3. Συνθήκες μηχανικής διάτασης	50
Αρχή Μεθόδου	50
Υλικά	50
3.1 Συσκευή μηχανικής διάτασης	50
4. Επίδραση αζιθρομυκίνης και LPS	51
Εισαγωγή	51
Υλικά	52

Διαλύματα εργασίας	52
Πειραματική πορεία	52
5. Επίδραση των αναστολέων: κυκλοεξιμίδιο και ακτινομυκίνη	53
Υλικά	53
Πειραματική εκτέλεση	53
6. Παραλαβή κυττάρων	54
Αρχή Μεθόδου	54
Υλικά-Συσκευές	54
Πειραματική εκτέλεση	54
7. Προσδιορισμός πρωτεΐνης κατά Bradford	55
Αρχή μεθόδου	55
Υλικά-Συσκευές	55
Διαλύματα εργασίας	56
Πειραματική εκτέλεση	56
Επεξεργασία αποτελεσμάτων	57
8. Προσδιορισμός πρωτεΐνης κατά Lowry	58
Αρχή μεθόδου	58
Υλικά	58
Διαλύματα	58
Πειραματική εκτέλεση	59
Επεξεργασία αποτελεσμάτων	60
9. Φθορισμομετρικός προσδιορισμός PLA₂	61
Αρχή μεθόδου	61
Υλικά-Όργανα	61
Διαλύματα εργασίας	61

Πειραματική εκτέλεση	62
10. Ανίχνευση ισοενζύμων φωσφολιπάσης A₂	64
10.1 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδιου	64
Αρχή μεθόδου	64
Υλικά-Συσκευές	64
Διαλύματα	65
Πειραματική πορεία	67
10.2 Ανοσοαποτύπωση πρωτεϊνών	69
Αρχή μεθόδου	69
Υλικά-Όργανα	70
Διαλύματα	70
Πειραματική πορεία	71
11. Προσδιορισμός IL-6	73
Αρχή μεθόδου	73
Υλικά	73
12. Αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης	74
12.1 PCR	74
Αρχή Μεθόδου	74
12.2 Συστατικά της αντίδρασης PCR	76
12.3 Real Time PCR	77
Πειραματική εκτέλεση	78
Απομόνωση RNA	78
Υλικά-Όργανα	78
Ποσοτικός προσδιορισμός RNA	80
Υλικά- Όργανα	80
RT- PCR	81

Υλικά-Όργανα	81
Ηλεκτροφόρηση προϊόντων RT-PCR ανάλυσης σε πήκτωμα αγαρόζης	81
Υλικά-Όργανα	81
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	83
1. Καμπύλη ανάπτυξης των κυττάρων A549	84
2. Καμπύλη ανάπτυξης των κυττάρων H441	86
3. Επίδραση μηχανικής διάτασης και LPS στα κύτταρα A549	87
3.1 Επίπεδα πρωτεΐνης	87
3.2 Ανοσοανίχνευση ισοενζύμων φωσφολιπάσης A ₂	88
Εκκρινόμενη φωσφολιπάση A ₂ τύπου IIA στα κύτταρα	88
Εκκρινόμενη φωσφολιπάση A ₂ τύπου IIA στα υπερκείμενα των κυττάρων	89
Εκκρινόμενη φωσφολιπάση A ₂ τύπου V	89
Εκκρινόμενη φωσφολιπάση A ₂ τύπου X	89
4. Επίδραση μηχανικής διάτασης και LPS σε κυψελιδικά μακροφάγα από BAL	90
4.1 Ανοσοανίχνευση ισοενζύμων φωσφολιπάσης A ₂	90
Εκκρινόμενη φωσφολιπάση A ₂ τύπου IIA στα κύτταρα	90
Εκκρινόμενη φωσφολιπάση A ₂ τύπου IIA στα υπερκείμενα των κυττάρων	91
Εκκρινόμενη φωσφολιπάση A ₂ τύπου V	91
Εκκρινόμενη φωσφολιπάση A ₂ τύπου X	91
5. Επίδραση LPS και αζιθρομυκίνης σε κύτταρα A549	92
5.1 Επίπεδα πρωτεΐνης	92
5.2 Προσδιορισμός ενεργότητας ολικής φωσφολιπάσης A ₂	93
5.3 Ανοσοανίχνευση ισοενζύμων φωσφολιπάσης A ₂	94

Κυτοσολική και φωσφορυλιωμένη φωσφολιπάση A_2 στα κύτταρα A549	94
Εκκρινόμενη φωσφολιπάση A_2 τύπου IIA στα κύτταρα	95
Εκκρινόμενη φωσφολιπάση A_2 τύπου IIA στα υπερκείμενα των κυττάρων	96
Εκκρινόμενη φωσφολιπάση A_2 τύπου V	98
Εκκρινόμενη φωσφολιπάση A_2 τύπου X	98
5.4 Προσδιορισμός έκφρασης του ενζύμου sPLA $_2$ IIA στα κύτταρα A549	99
5.5 Προσδιορισμός IL-6 στα υπερκείμενα των κυττάρων A549	101
6. Επίδραση των αναστολέων κυκλοοξειμίδιο και ακτινομυκίνη στα κύτταρα A549	102
6.1 Ανοσοανίχνευση ισοενζύμων φωσφολιπάσης A_2	102
Εκκρινόμενη φωσφολιπάση A_2 τύπου IIA στα κύτταρα A549	102
Εκκρινόμενη φωσφολιπάση A_2 τύπου IIA στα υπερκείμενα των κυττάρων	103
7. Επίδραση LPS και αζιθρομυκίνης σε κυψελιδικά μακροφάγα από BAL	104
7.1 Ανοσοανίχνευση ισοενζύμων φωσφολιπάσης A_2	104
Εκκρινόμενη φωσφολιπάση A_2 τύπου IIA στα BALF	104
Εκκρινόμενη φωσφολιπάση A_2 τύπου IIA στα κυψελιδικά μακροφάγα	104
Εκκρινόμενη φωσφολιπάση A_2 τύπου IIA στα υπερκείμενα των κυψελιδικών μακροφάγων	106
Συμπεράσματα-Συζήτηση	107
Περίληψεις	116
Βιβλιογραφία	118

ΣΚΟΠΟΣ

Ο σκοπός της εργασίας αυτής εστιάζεται στη διερεύνηση της επίδρασης της μηχανικής αναπνοής και της αζιθρομυκίνης στην επαγόμενη παραγωγή και έκκριση της PLA₂ μετά από επίδραση με LPS.

Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε η κυτταρική σειρά A549, ως μοντέλο μελέτης των πνευμονοκυττάρων τύπου II, καθώς και πρωτογενείς καλλιέργειες κυψελιδικών μακροφάγων από ασθενείς με Σύνδρομο Οξείας Αναπνευστικής Δυσχέρειας (ARDS) ή όχι (CONTROL). Συγκεκριμένα πραγματοποιήθηκε:

- Διερεύνηση της παραγωγής και έκκρισης της PLA₂ μετά από επίδραση με LPS (1μg/ml), stretch σε διάφορες χρονικές στιγμές (30 min, 1h, 4h και 24h), καθώς και συνδυασμό τους, τόσο στα κύτταρα A549 όσο και στα κυψελιδικά μακροφάγα.
- Διερεύνηση της παραγωγής και της έκκρισης της PLA₂ μετά από επίδραση με LPS (1μg/ml), αζιθρομυκίνη σε 2 διαφορετικές συγκεντρώσεις 5μg/ml και 20μg/ml, καθώς και συνδυασμό τους, τόσο στα κύτταρα A549 όσο και στα κυψελιδικά μακροφάγα.
- Προσδιορισμός έκφρασης του ενζύμου.
- Προσδιορισμός πρωτεϊνών, φλεγμονωδών παραγόντων όπως IL-6, και ενεργότητας ολικής PLA₂.

Η PLA₂ χρησιμοποιήθηκε ως δείκτης φλεγμονής ενώ ο LPS ως θετικό control για την παραγωγή και έκκριση της PLA₂.

ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ

- **ALI** (*Acute Lung Injury*) = οξεία πνευμονική βλάβη
- **AMφ** (*Alveolar Macrophages*) = κυψελιδικά μακροφάγα
- **ARDS** (*Acute Respiratory Distress Syndrome*) = Σύνδρομο Οξείας Αναπνευστικής Δυσχέρειας
- **BAL** (*Bronchoalveolar Lavage*) = Βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα
- **BSA** (*Bovine Serum Albumin*), Αλβουμίνη ορού βοός
- **C₁₂-NBD-PC** (*1-palmitoyl-2-[12-[(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)amino] dodecanoyl]-sn-glycero-3-phosphocholine*)
- **C₁₂-NBD-FA** (*12-[(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)amino] dodecanoic acid*)
- **cAMP** (*cyclic Adenosine Monophosphate*) = κυκλική μονοφωσφορική αδενοσίνη
- **COPD** (*Chronic Obstructive Pulmonary Disease*) = Χρόνια Αποφρακτική Πνευμονοπάθεια
- **COX** (*Cyclooxygenase*) = κυκλοξυγενάση
- **cPLase A₂** (*cytosolic Phospholipase A₂*) = κυτοσολική Φωσφολιπάση A₂
- **DAG** (*Diacylglycerol*) = Διακυλογλυκερόλη
- **DPB** (*Diffuse panbronchiolitis*) = Διάχυτη πανβρογχιολίτιδα
- **EDTA** (*Ethylene-Diamine-Tetra-Acetic acid*) = Αιθυλενο-διαμινο-τετρα-οξικό οξύ
- **FBS** (*Fetal Bovine Serum*) = Ορός βοός• **HETE** (*5-hydroperoxyeicosatetraenoic acid*) = Υδροξυεικοσατετραενοϊκό οξύ
- **IFN-γ** (*Interferon-γ*) = ιντερφερόνη-γ
- **IL-1** (*Interleukin 1*) = Ιντερλευκίνη 1
- **IL-6** (*Interleukin 6*) = Ιντερλευκίνη 6
- **IL-8** (*Interleukin 8*) = Ιντερλευκίνη 8
- **iPLA₂** (*independent Phospholipase A₂*) = Φωσφολιπάση A₂ ανεξάρτητη Ca²⁺
- **LO** (*Lipoxygenase*) = λιποξυγενάση
- **LPS** (*Lipopolysaccharide*) = Λιποπολυσακχαρίτης
- **LTs** (*Leukotriens*) = λευκοτριένια
- **Mφ** (*Macrophages*) = μακροφάγα
- **MODS** (*MultiOrgan Dysfunction Syndrome*) = Σύνδρομο Πολυοργανικής Ανεπάρκειας

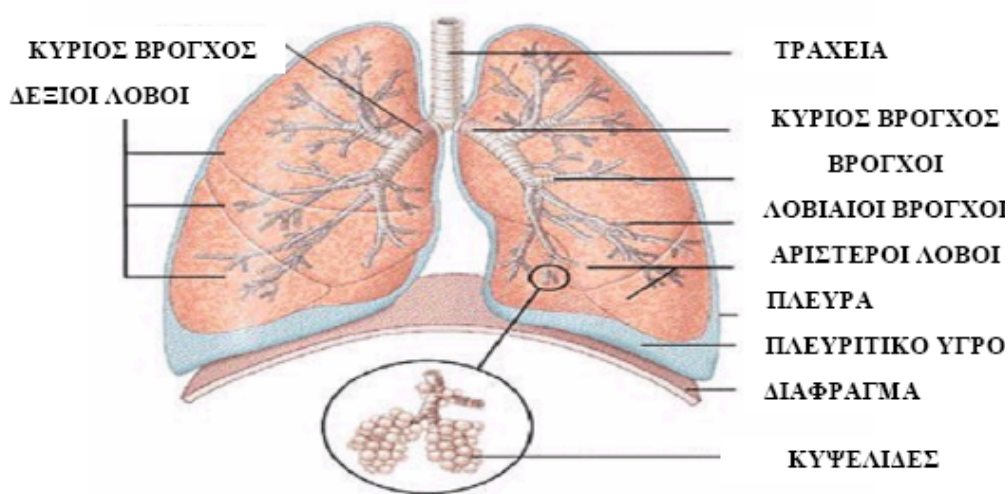
-
- **MyD88** (*Myeloid differentiation factor 88*) = Μυελοειδής παράγοντας διαφοροποίησης 88
 - **PAGE** (*PolyAcrylamide Gel Electrophoresis*) = Ηλεκτροφόρηση πολυακρυλαμίδιου
 - **PAF** (*Platelet-Activating Factor*) = Παράγοντας ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων
 - **PAF-AcH** (*PAF-Acetylhydrolase*) = Ακετυλυδρολάση του παράγοντα ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων
 - **PBS** (*Phosphate Buffer Saline*) = Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων
 - **PC** (*Phosphatidylcholine*) = Φωσφατιδυλοχολίνη
 - **PG** (*Phosphatidylglycerol*) = Φωσφατιδυλογλυκερόλη
 - **PGs** (*Prostaglandins*) = Προσταγλανδίνες
 - **Phospho-cPLA₂** (*phosphorylated cPLA₂*) = φωσφορυλιωμένη cPLA₂
 - **PI** (*Phosphatidylinositol*) = Φωσφατιδυλινοσιτόλη
 - **PLA₂** (*Phospholipase A₂*) = Φωσφολιπάση A₂
 - **PLC** (*Phospholipase C*) = Φωσφολιπάση C
 - **SDS** (*Sodium Dodecyl Sulphate*) = Δωδεκυλοθειικό νάτριο
 - **SIRS** (*Systemic Inflammatory Response Syndrome*) = σύνδρομο συστημικής φλεγμονώδους απόκρισης

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. ΚΥΤΤΑΡΑ ΤΟΥ ΠΝΕΥΜΟΝΑ

1.1 Ανατομία του αναπνευστικού συστήματος

Το αναπνευστικό σύστημα των θηλαστικών είναι υπεύθυνο για την πρόσληψη του O_2 από την ατμόσφαιρα και την αποβολή του CO_2 από τον οργανισμό. Διακρίνεται στο ανώτερο αναπνευστικό σύστημα, που περιλαμβάνει τη μύτη και το φάρυγγα και στο κατώτερο, που περιλαμβάνει το λάρυγγα, την τραχεία, τους βρόγχους και τους πνεύμονες (**Σχήμα 1**).



Σχήμα 1. Σχηματική αναπαράσταση του ανθρώπινου πνεύμονα

Η τραχεία διαιρείται στο δεξιό πρωτεύοντα (στελεχιαίο) και στον αριστερό πρωτεύοντα βρόγχο, που κατευθύνονται στους αντίστοιχους πνεύμονες. Οι στελεχιαίοι βρόγχοι κατά την είσοδό τους στους πνεύμονες διαιρούνται σε μικρότερους βρόγχους, τους λοβαίους, έναν για κάθε λοβό του πνεύμονα (τρεις στο δεξιό και δύο στον αριστερό). Η διακλάδωση αυτή συνεχίζεται σχηματίζοντας διαρκώς μικρότερους βρόγχους, τους τμηματικούς, οι οποίοι διαιρούνται στους υποτμηματικούς και τελικά στα βρογχιόλια, που και αυτά διαιρούνται σε ακόμα μικρότερα βρογχιόλια. Ο συνολικός αυτός σχηματισμός ονομάζεται βρογχικό δέντρο [1,2].

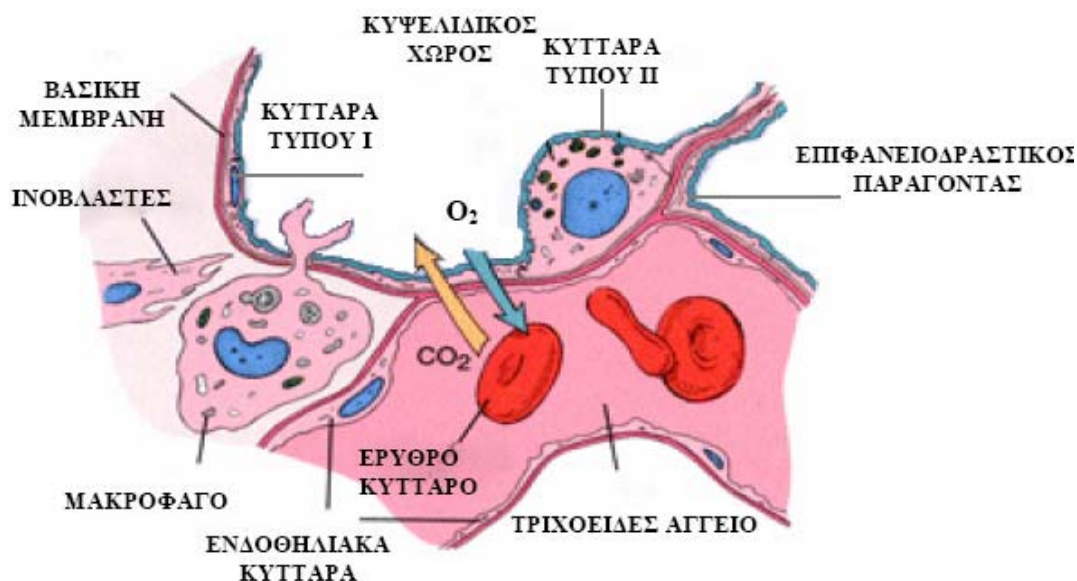
Στα βρογχιόλια κάνουν την εμφάνισή τους οι πρώτες κυψελίδες για να κυριαρχήσουν στους κυψελιδικούς σάκους που μοιάζουν με τσαμπιά γεμάτα κυψελίδες. Το τμήμα του βρογχικού δέντρου μετά το τελικό βρογχιόλιο, εκεί που γίνεται η ανταλλαγή των αερίων, λέγεται αναπνευστική μονάδα.

Τα αιμοφόρα αγγεία σχηματίζουν μια σειρά διακλαδιζόμενων σωληνώσεων από την πνευμονική αρτηρία μέχρι τα τριχοειδή αγγεία, στη συνέχεια τα τριχοειδή αγγεία μεταπίπτουν στα φλεβικά τριχοειδή αγγεία και τελικά σχηματίζουν τις πνευμονικές φλέβες. Τα τριχοειδή αγγεία σχηματίζουν ένα πολύ πυκνό πλέγμα μέσα στο τοίχωμα κάθε κυψελίδας. Με τη διάταξη αυτή, κάθε ερυθρό αιμοσφαίριο που είναι μέσα στα τριχοειδή έρχεται σε εκτεταμένη επαφή με την κυψελιδοτριχοειδική μεμβράνη, γεγονός που διευκολύνει την ανταλλαγή αερίων στους πνεύμονες [2].

Οι πνεύμονες χωρίζονται σε δεξιό και αριστερό, είναι κωνικού σχήματος και βρίσκονται στη θωρακική κοιλότητα. Χωρίζονται ο ένας από τον άλλο από την καρδιά και από τους άλλους σχηματισμούς του μεσοθωράκιου χώρου. Περικλείονται από δύο μεμβράνες : η εξωτερική συνδέεται στα τοιχώματα του θώρακα και ονομάζεται τοιχωματικό πέταλο υπεζωκότος, η εσωτερική είναι το σπλαχνικό πέταλο και καλύπτει τους πνεύμονες. Ανάμεσα στις μεμβράνες υπάρχει υγρό το οποίο εκκρίνεται από τις ίδιες τις μεμβράνες και μειώνει την τριβή κατά την αναπνοή. Κάθε πνεύμονας χωρίζεται σε λοβούς εξ' αιτίας μιας πλάγιας σχισμής. Ο δεξιός διαθέτει και μια οριζόντια σχισμή με αποτέλεσμα να έχει τρεις λοβούς. Σε κάθε λοβό συνίσταται ο δευτερεύων βρόγχος, ο οποίος θα διαιρεθεί και θα δώσει τους τμηματικούς βρόγχους, που ήδη αναφέρθηκαν. Το τμήμα του πνεύμονα που τροφοδοτεί κάθε τμηματικός βρόγχος ονομάζεται βρογχοπνευμονικό τμήμα. Τα τμήματα αυτά έχουν πολλά μικρά διαμερίσματα που ονομάζονται λοβία. Αυτά περιβάλλονται από ελαστικό συνδετικό ιστό και περιέχουν λεμφικά αγγεία, τελικές αρτηρίες και φλέβες και ένα κλάδο από τελικό βρογχιόλιο. Τα τελικά βρογχιόλια διαιρούνται σε μικρότερους κλάδους, τα αναπνευστικά βρογχιόλια. Αυτά διακλαδίζονται στους κυψελιδικούς πόρους, στην επιφάνεια των οποίων βρίσκονται, όπως αναφέρθηκε, οι κυψελίδες και οι κυψελιδικοί σάκοι.

Οι κυψελίδες είναι σφαιρικά θυλάκια που αποτελούνται από επιθηλιακό ιστό και περιβάλλονται από ελαστική βασική μεμβράνη (**Σχήμα 2**). Οι κυψελιδικοί σάκοι είναι συγκροτήματα δύο ή περισσότερων κυψελίδων που μοιράζονται την ίδια είσοδο. Το επιθήλιο των κυψελίδων σχηματίζεται κυρίως από πνευμονοκύτταρα τύπου I, και από πνευμονοκύτταρα τύπου II, τα οποία είναι περισσότερα σε αριθμό σχετικά με τα κύτταρα τύπου I, καλύπτουν όμως πολύ μικρότερη έκταση επιφάνειας. Αυτά εκκρίνουν υγρό το οποίο διατηρεί τις κυψελίδες υγρές. Στο υγρό αυτό υπάρχει και ο επιφανειοδραστικός παράγοντας, ένα μίγμα φωσφολιπιδίων και πρωτεϊνών, που

μειώνει την επιφανειακή τάση και εμποδίζει τις κυψελίδες από κατάρρευση στο τέλος της εκπνοής. Στην περιοχή των κυψελίδων βρίσκονται και τα κυψελιδικά μακροφάγα, που αφαιρούν σωματίδια σκόνης και άλλα υπολείμματα. Παρόντα είναι επίσης και μονοκύτταρα και λευκά αιμοσφαίρια τα οποία μετατρέπονται σε μακροφάγα, καθώς και ινοβλάστες που παράγουν δικτυωτές και ελαστικές ίνες [1,2,3,4]. Στα κύτταρα αυτά θα γίνει αναφορά στη συνέχεια.



Σχήμα 2. Δομή κυψελίδας

Η ανταλλαγή των αερίων ανάμεσα στους πνεύμονες και το αίμα γίνεται με διάχυση διαμέσου των τοιχωμάτων των κυψελίδων και των τριχοειδών. Οι επιφάνειες μέσα από τις οποίες γίνεται η διάχυση των αερίων είναι γνωστές ως τριχοειδοκυψελιδική μεμβράνη και αποτελείται:

1. Από την στοιβάδα κυττάρων τύπου I και κυττάρων τύπου II που μαζί με ελεύθερα μακροφάγα αποτελούν το κυψελιδικό (επιθηλιακό) τοίχωμα.
2. Από την επιθηλιακή βασική μεμβράνη κάτω από το κυψελιδικό τοίχωμα.
3. Από την τριχοειδή βασική μεμβράνη.
4. Από τα κύτταρα του ενδοθηλίου των τριχοειδών.

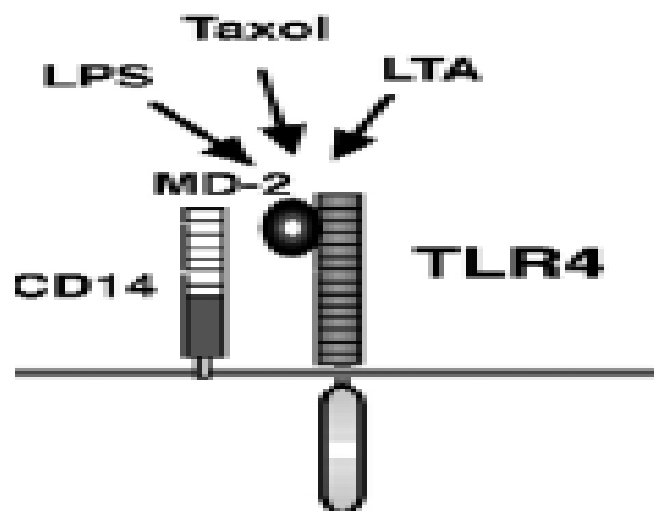
1.2 Τα κύτταρα του κυψελιδικού χώρου

Ο κυψελιδικός χώρος, εξ' αιτίας της κατασκευής του, έχει την ιδιομορφία να βρίσκεται στο εσωτερικό του οργανισμού και να είναι ταυτόχρονα σε επαφή με το περιβάλλον μέσω της εισροής του αέρα κατά την διαδικασία της αναπνοής. Είναι, έτσι, εκτεθειμένος σε μικρά σωματίδια ύλης άλλα και σε μία μεγάλη ποικιλία μικροοργανισμών. Για την προστασία του οργανισμού από αυτούς τους παράγοντες, στον κυψελιδικό χώρο εντοπίζονται κύτταρα του ανοσολογικού συστήματος. Η πλειοψηφία των κυττάρων που έχουν βρεθεί, είναι τα κυψελιδικά μακροφάγα που αποτελούν το 86%. Έχουν, επίσης, βρεθεί λεμφοκύτταρα (11%), ουδετερόφιλα (5%), ηωσινόφιλα (1%), ενώ έχουν βρεθεί και βασεόφιλα και ιστιοκύτταρα .

Τα μακροφάγα , τα οποία βρίσκονται στον κυψελιδικό χώρο και στον διάμεσο χώρο μεταξύ ενδοθηλίου και κυψελιδικού επιθηλίου αποτελούν την πρώτη γραμμή άμυνας του πνεύμονα. Διαδραματίζουν εξαιρετικά σημαντικό ρόλο στη λειτουργία του αναπνευστικού συστήματος ρυθμίζοντας την κυτταρική ανάπτυξη, το μεταβολισμό λιπιδίων και την απομάκρυνση βιολογικών απορριμμάτων. Σε καταστάσεις φλεγμονής στρατολογούνται στις προβληματικές περιοχές μέσω φλεγμονωδών μεσολαβητών, έχοντας δύο αποστολές: φλεγμονώδεις και αντι-φλεγμονώδεις αποκρίσεις. Η φλεγμονώδης αντίδραση έχει ως στόχο τη σύνθεση και έκκριση πρωτεϊνών, τη χημειοταξία ουδετερόφιλων, τη φαγοκυττάρωση ξένων σωμάτων, την κυτταροτοξικότητα. Στις αντι-φλεγμονώδεις αντιδράσεις συμπεριλαμβάνονται η εκκαθάριση βιολογικών απορριμμάτων, η παρεμπόδιση φλεγμονής, όπως μέσω του αγωνιστή του υποδοχέα IL-1, η ενεργοποίηση της επανόρθωσης του συνδετικού ιστού και η αγγειογένεση.

Ένα βασικό χαρακτηριστικό των μακροφάγων είναι η ικανότητά τους για ενεργοποίηση, η οποία είναι ουσιαστικά η διαδικασία της πλήρους διαφοροποίησής τους. Το αδιαφοροποίητο μακροφάγο, στερείται αρκετών υποδοχέων στην επιφάνειά του, ενώ η ενέργεια του οξυγόνου καταναλώνεται κυρίως για φωσφορυλιώσεις και κυτταρικό μεταβολισμό. Σε αυτή την κατάσταση, το κύτταρο είναι ικανό για φαγοκυττάρωση και πολλαπλασιασμό. Ως απόκριση όμως σε φλεγμονώδεις μεσολαβητές, επέρχεται διαφοροποίηση και ενεργοποίηση. Η ενεργοποίηση αυτή προέρχεται παρουσία ενός δεύτερου σήματος, όπως LPS όπου πλέον τα μακροφάγα συνθέτουν και εκκρίνουν ένα πλήθος κυτοκινών και δρουν ως λειτουργικά αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα. Ο LPS, βακτηριακός λιποπολυσακχαρίτης, αποτελεί βασικό συστατικό της μεμβράνης των αρνητικά κατά gram βακτηρίων. Για αρκετό διάστημα, θεωρείτο ότι υποδοχέας του LPS είναι το CD14 [5], μια γλυκοπρωτεΐνη η οποία βρίσκεται στην εξωτερική μεμβράνη των μακροφάγων [6,7,8]. Η πρωτεΐνη όμως αυτή, δεν διαθέτει κυτταροπλασματική περιοχή έτσι ώστε

να μπορεί να μεταβιβάσει το ερέθισμα ενδοκυττάρια. Το πρόβλημα λύθηκε με την ανακάλυψη ενός ακόμα υποδοχέα, του Toll like receptor (TLR) και ειδικότερα του TLR-4. Επιμόλυνση κυτταρικών σειρών χωρίς TLR-4 με τον συγκεκριμένο υποδοχέα όμως, δεν μπορούσε να τις καταστήσει ευαίσθητες στο LPS [9,10]. Ήταν λοιπόν εμφανές ότι ένας ακόμη υποδοχέας θα έπρεπε να συνυπάρχει στην επιφάνεια των μακροφάγων. Η πρωτεΐνη αυτή ήταν η MD-2, η οποία όταν συν-επιμόλυνε τις σειρές με τον TLR-4 τις καθιστούσε πλέον ικανές προς απόκριση στο LPS [11]. Βρέθηκε λοιπόν ότι ο υποδοχέας του LPS στα μακροφάγα αποτελείται από ένα σύμπλεγμα στο οποίο συνυπάρχουν ο TLR-4, η πρωτεΐνη MD-2 και ο υποδοχέας CD14 (**Σχήμα 3**) [12]. Τα ενδοκυττάρια σηματοδοτικά γεγονότα τα οποία ακολουθούν την πρόσδεση του LPS στο σύμπλοκο αυτό, δεν έχουν διευκρινιστεί πλήρως ακόμα. Υπάρχουν πειραματικά δεδομένα τα οποία υποδεικνύουν την συμμετοχή G πρωτεϊνών [13], φωσφολιπάσης C, πρωτεϊνικής κινάσης A και πρωτεϊνικής κινάσης C καθώς και MAP κινασών. Το τελικό στάδιο αποτελεί η ενεργοποίηση και μεταφορά του NF-κB στον πυρήνα και η έκφραση κιτοκινών και άλλων φλεγμονωδών παραγόντων.



Σχήμα 3. Σχηματική αναπαράσταση του συμπλόκου που αποτελεί τον υποδοχέα του LPS. Διαφαίνεται ο υποδοχέας TLR-4 και CD14 καθώς και η πρωτεΐνη MD-2 [12].

Τα ουδετερόφιλα ανήκουν στα κύτταρα του ανοσολογικού συστήματος που έχουν ως βασικό ρόλο τη φαγοκύτωση. Αποτελούν την πλειοψηφία των λευκοκυττάρων του αίματος και έχουν την ικανότητα να μεταναστεύουν στους ιστούς [14].

Ο αριθμός των λεμφοκυττάρων στις κυψελίδες του φυσιολογικού πνεύμονα είναι μικρός (5-10%). Έχουν βρεθεί όλα τα είδη λεμφοκυττάρων (T και B) με κυρίαρχα τα T. Ο ρόλος των λεμφοκυττάρων στον πνεύμονα εντοπίζεται σε τρία σημεία :

- α) Παραγωγή αντισωμάτων για την οποία είναι υπεύθυνα τα B κύτταρα
- β) Κυτοτοξική δράση, η οποία συμπεριλαμβάνει λύση κυττάρων που έχουν προσβληθεί από ιούς, κυττάρων δηλαδή που παρουσιάζουν συγκεκριμένα αντισώματα. Την κυτοτοξική δράση την ασκούν τα T λεμφοκύτταρα αλλά και τα φυσικά κύτταρα-φονιάδες.
- γ) Παραγωγή κυτοκινών, η οποία γίνεται από τα T_H κύτταρα.

Χαρακτηριστικό των ηωσινόφιλων είναι ότι έχουν πυρήνα που σχηματίζει δύο λοβούς και ότι περιέχουν στο κυτόπλασμα κοκκία με κρυσταλλοειδής πυρήνες και περιέχουν τοξικές πρωτεΐνες. Είναι υπεύθυνα για την άμυνα εναντίον στόχων που δεν μπορούν να φαγοκυτωθούν. Έχουν τη δυνατότητα να ελευθερώνουν τοξικά ενδιάμεσα του οξυγόνου [15].

Στα ιστιοκύτταρα, αρχικά, είχε αποδοθεί αντίστοιχος ρόλος με αυτόν των μακροφάγων απομάκρυνσης σωματιδίων και υπολειμμάτων. Σήμερα αναγνωρίζονται ως φορείς μιας μεγάλης ποικιλίας διαβιβαστών και θεωρούνται πρόδρομα κύτταρα της φλεγμονής ικανά να εκκρίνουν πρωτεάσες, κυτοκίνες και διαβιβαστές που έχουν την δυνατότητα να ξεκινήσουν αλλά και να υποστηρίξουν την φλεγμονή. Παίζουν βασικό ρόλο στη φλεγμονώδη αντίδραση που συνοδεύει το άσθμα, αλλά και βασικό ρόλο στη διαδικασία της πνευμονικής ίνωσης.

2. ΣΥΝΔΡΟΜΟ ΟΞΕΙΑΣ ΑΝΑΠΝΕΥΣΤΙΚΗΣ ΔΥΣΧΕΡΕΙΑΣ (ARDS)

2.1 Γενικά

Το σύνδρομο οξείας αναπνευστικής δυσχέρειας (Acute Respiratory Distress Syndrome, ARDS) περιγράφηκε για πρώτη φορά από τον Ashbaugh et al το 1967 [16]. Είναι η βαρύτερη μορφή της οξείας πνευμονικής βλάβης (Acute Lung Injury, ALI). Η οξεία πνευμονική βλάβη είναι ένας γενικός όρος που αναφέρεται σε οξείες καταστάσεις, οι οποίες χαρακτηρίζονται από υποξαιμία και παθολογική ακτινογραφία θώρακος.

Το ARDS είναι ένα σύνδρομο με οξεία έναρξη, που χαρακτηρίζεται από φλεγμονή και αυξημένη διαπερατότητα της τριχοειδοκυψελιδικής μεμβράνης. Συνδυάζεται με κλινικές και ακτινολογικές διαταραχές, που δεν μπορούν να αποδοθούν σε υπέρταση του αριστερού κόλπου ή των πνευμονικών τριχοειδών αγγείων [17].

Σήμερα θεωρείται ότι το ARDS είναι ένα παθοφυσιολογικό αποτέλεσμα που προκαλείται από διάχυτη πνευμονική βλάβη και επηρεάζει το πνευμονικό παρέγχυμα, το τριχοειδοκυψελιδικό μεσοδιάστημα, τα αγγεία και τους αεραγωγούς.

2.2 Κλινική ταξινόμηση

Η φάση της δημιουργίας του πνευμονικού οιδήματος αυξημένης διαπερατότητας, χαρακτηρίζεται ως πρώιμο (early) ARDS και διαρκεί μέχρι τρεις μέρες από την έναρξη της οξείας πνευμονικής βλάβης. Σ' αυτό το πρώιμο στάδιο, οι περισσότεροι ασθενείς επιβιώνουν (περίπου το 85-95%). Μετά τη φάση αυτή, και μεταξύ της τρίτης και της έβδομης περίπου μέρας από την έναρξη του συνδρόμου, ακολουθεί η παραγωγική φάση ή όψιμο (late) ARDS [18]. Στη συνέχεια, ορισμένοι ασθενείς μεταπίπτουν στην επόμενη φάση, που χαρακτηρίζεται από τη δημιουργία ινώδους ιστού στον διάμεσο ιστό και στις κυψελίδες. Η φάση αυτή τοποθετείται χρονικά μετά την πρώτη εβδομάδα από την έναρξη του ARDS και ονομάζεται ινωτική (fibrotic). Σε άλλους ασθενείς, η εξέλιξη της παραγωγικής φάσης γίνεται προς την κατεύθυνση της αποκατάστασης της φυσιολογικής αρχιτεκτονικής του πνευμονικού παρεγχύματος (tissue repair) και της πλήρους ίασης. Η διάκριση της εξέλιξης του ARDS σε φάσεις είναι σε μεγάλο βαθμό αυθαίρετη. Από διάφορα στοιχεία φαίνεται ότι η μετάβαση από την πρώιμη στην όψιμη φάση είναι προοδευτική. Η ανάπτυξη του

συνδετικού ιστού αρχίζει από τα πρώτα 24ωρα. Έτσι, μερικοί ερευνητές τοποθετούν μια ενδιάμεση (intermediate) φάση μεταξύ της πρώιμης και της όψιμης φάσης.

Στις περιπτώσεις που η διάχυτη κυψελιδική βλάβη εξελίσσεται μέχρι το ινωτικό στάδιο, η αναπνευστική λειτουργία δεν βελτιώνεται και η πρόγνωση συχνά είναι κακή. Μετά από μια παρατεταμένη περίοδο συστηματικής φλεγμονώδους αντίδρασης (πυρετός, ταχύπνοια, ταχυκαρδία), σήψης και δυσλειτουργίας ή ανεπάρκειας πολλών οργάνων (Multiple Organ Dysfunction Syndrome και Multiple Organ Failure αντίστοιχα) παρά τη συνεχή μηχανική υποστήριξη της αναπνοής, οι ασθενείς καταλήγουν. Αντίθετα, όσοι ασθενείς θεραπεύονται από την οξεία βλάβη του πνεύμονα, ανακτούν φυσιολογική αναπνευστική λειτουργία [19].

Έτσι, το ARDS κατατάσσεται σε πρώιμο (early) (1-3 ημέρες από την εκδήλωσή του), ενδιάμεσο (intermediate) (4-6 ημέρες) και όψιμο (late) (>7 ημέρες από την εκδήλωσή του).

2.3 Αίτια εμφάνισης του ARDS

Κοινό χαρακτηριστικό όλων των μορφών του ARDS είναι η βλάβη της τριχοειδοκυψελιδικής μεμβράνης είτε από την πλευρά του αέρα (κυψελιδικό επιθήλιο), είτε από την πλευρά του αίματος (τριχοειδικό ενδοθήλιο). Οι παράγοντες που προσβάλλουν το κυψελιδικό επιθήλιο χαρακτηρίζονται ως άμεσοι, ενώ αυτοί που προσβάλλουν το κυψελιδικό ενδοθήλιο ως έμμεσοι (**Πίνακας 1**) [20].

Ανεξάρτητα από τις διαφορετικές αιτιολογίες, οι κλινικές, παθοφυσιολογικές και ιστοπαθολογικές διαταραχές στο ARDS είναι κοινές.

Πίνακας 1. Παράγοντες κινδύνου εμφάνισης του ARDS

Παράγοντες κινδύνου εμφάνισης του ARDS	
άμεσοι	έμμεσοι
εισρόφηση	σήψη
πνευμονική λοίμωξη	σοβαρός τραυματισμός
θάλαση πνεύμονος	πολλαπλές μεταγγίσεις
εισπνοή τοξικών ουσιών	λιπώδης εμβολή
παρολίγον πνιγμός	οξεία παγκρεατίτιδα

2.4 Μηχανισμοί πρόκλησης της βλάβης

Η οξεία αναπνευστική βλάβη περιλαμβάνει διαταραχές του ενδοθηλίου των τριχοειδών αγγείων και του κυψελιδικού επιθηλίου. Ο μηχανισμός της βλάβης είναι είτε άμεσος στα κύτταρα του πνεύμονα, είτε έμμεσος ως αποτέλεσμα οξείας συστηματικής φλεγμονώδους απόκρισης.

2.4.1 Δημιουργία πνευμονικού οιδήματος

Το κύριο χαρακτηριστικό του ARDS είναι η δημιουργία οιδήματος στον πνεύμονα. Ως πνευμονικό οίδημα ορίζεται η παθολογική συσσώρευση εξωαγγειακού ύδατος στους πνεύμονες και κατατάσσεται σε τρεις κατηγορίες ανάλογα με την αιτιολογία :

✓ Οίδημα αυξημένων υδροστατικών πιέσεων

Η συχνότερη αιτία των αυξημένων υδροστατικών πιέσεων στην πνευμονική κυκλοφορία είναι η αριστερή καρδιακή ανεπάρκεια και η αύξηση της πίεσης του αριστερού κόλπου.

✓ Οίδημα αυξημένης διαπερατότητας των αγγείων του πνεύμονα

Είναι το πνευμονικό οίδημα που οφείλεται στην αυξημένη διαπερατότητα της τριχοειδοκυψελιδικής μεμβράνης.

✓ Οίδημα μικτό ή αδιευκρίνιστο

Στην κατηγορία αυτή αναφέρονται το πνευμονικό οίδημα από πνευμονική εμβολή, το πνευμονικό οίδημα από μεγάλο υψόμετρο, το νευρογενές πνευμονικό οίδημα και το πνευμονικό οίδημα μετά από σπασμούς.

2.4.2 Ρόλος της τριχοειδοκυψελιδικής μεμβράνης

Το πρώτο μηχανικό φράγμα που δεν επιτρέπει τη διαρροή πλάσματος από τον αγγειακό χώρο, είναι το ενδοθήλιο των τριχοειδών αγγείων. Τα ενδοθηλιακά κύτταρα βρίσκονται ενωμένα μεταξύ τους ώστε να παρεμποδίζεται η έξοδος των πρωτεϊνών του πλάσματος. Το ενδοθήλιο έχει φυσιολογική μικρή διαπερατότητα [21]. Πρωτεϊνικά μόρια μικρού μοριακού βάρους μπορούν να εισέρχονται στο διάμεσο χώρο κατά ένα ελεγχόμενο τρόπο. Αυξημένη διέλευση μακρομορίων και υγρών από το στρώμα του ενδοθηλίου στο διάμεσο χώρο θα συμβεί ύστερα από οποιαδήποτε προσβολή των ενδοθηλιακών κυττάρων που θα είχε ως αποτέλεσμα τη χαλάρωση των ενώσεων μεταξύ των κυττάρων, μείωση της προσκόλλησης αυτών στη βασική μεμβράνη ή μείωση της ζωτικότητάς τους. Εάν η αυξημένη ροή υγρών στο διάμεσο χώρο είναι μεγαλύτερη από εκείνη που μπορεί να διαχειριστεί το λεμφικό σύστημα, ο όγκος του διαμέσου χώρου θα εκπτυχθεί (διάμεσο πνευμονικό οίδημα). Επειδή όμως ο χώρος αυτός είναι περιορισμένος, στη συνέχεια τα υγρά θα κατευθυνθούν στον κυψελιδικό χώρο.

Το κύριο φράγμα που περιορίζει το πέρασμα των υγρών από το τριχοειδοκυψελιδικό μεσοδιάστημα στον κυψελιδικό χώρο είναι το κυψελιδικό επιθήλιο, το οποίο επικαλύπτεται από τα πνευμονοκύτταρα τύπου I και τύπου II. Αυτά τα κύτταρα είναι ενωμένα μεταξύ τους πολύ πιο ισχυρά από ότι τα ενδοθηλιακά κύτταρα. Έτσι, το επιθήλιο σχηματίζει ένα φράγμα πιο ισχυρό έναντι στη μετακίνηση υγρών από ότι το ενδοθήλιο. Οποιαδήποτε βλάβη που θα επέφερε χαλάρωση στις συνδέσεις των επιθηλιακών κυττάρων από τη βασική μεμβράνη ή θα μείωνε τη ζωτικότητά τους, θα προκαλούσε διαρροή υγρών από το διάμεσο χώρο στις κυψελίδες και κυψελιδικό πνευμονικό οίδημα [22].

Τα κυψελιδικά επιθηλιακά κύτταρα τύπου II, εκτός από τη συμμετοχή τους στο φυσικό φραγμό του κυψελιδικού επιθηλίου, παίζουν και έναν ακόμη ρόλο στη ρύθμιση της διακίνησης των υγρών στον κυψελιδικό χώρο, μέσω της σύνθεσης και έκκρισης του επιφανειοδραστικού παράγοντα. Η μείωση της επιφανειακής τάσης στη μεσόφαση αέρα/υγρού ελαττώνει τη δραστική πίεση μετακίνησης υγρού από τα αγγεία στο διάμεσο χώρο.

Συμπερασματικά, οποιαδήποτε βλάβη στο ενδοθήλιο των τριχοειδών αγγείων, στο κυψελιδικό επιθήλιο ή στο σύστημα του επιφανειοδραστικού παράγοντα μπορεί να προκαλέσει ARDS. Η αυξημένη διαπερατότητα της τριχοειδοκυψελιδικής μεμβράνης στο ARDS έχει καταδειχθεί σε πολλές μελέτες [23,24,25,26].

2.4.3. Φλεγμονή στον πνεύμονα

Υπάρχουν περισσότεροι του ενός μηχανισμοί που οδηγούν στη φλεγμονή [27] και στη δημιουργία οίδηματος. Σε μερικές μόνο περιπτώσεις ο μηχανισμός είναι σχετικά απλός, όπως όταν ένας εξωγενής παράγοντας προκαλεί άμεση βλάβη στα κύτταρα του τριχοειδοκυψελιδικού τοιχώματος [28]. Στις περισσότερες, όμως, περιπτώσεις που οδηγούν σε ARDS, η εξήγηση δεν είναι τόσο απλή όπως η άμεση τοξική επίδραση ενός εξωγενούς παράγοντα. Χωρίς αμφιβολία, πολλαπλοί μηχανισμοί συμμετέχουν. Σε πολλές περιπτώσεις ARDS, φαίνεται ότι μια γενική φλεγμονώδη αντίδραση είναι αυτή που οδηγεί στη διάχυτη βλάβη των κυψελίδων και στο οίδημα [29]. Όμως πού ακριβώς οφείλεται η αύξηση της διαπερατότητας του τριχοειδοκυψελιδικού φράγματος ;

Κύτταρα

Η οξεία φλεγμονώδης αντίδραση περιλαμβάνει κυτταρικούς και χυμικούς παράγοντες. Στην κυτταρική αντίδραση μπορεί να συμμετέχουν τα ουδετερόφιλα καθώς και κύτταρα που βρίσκονται εγκατεστημένα στο κυψελιδικό επιθήλιο (μακροφάγα, λεμφοκύτταρα). Καθοριστικό ρόλο στη διαδικασία της φλεγμονής μπορεί να παίζει επίσης η μετανάστευση φλεγμονωδών κυττάρων στο κυψελιδικό διάστημα και η τοπική απελευθέρωση φλεγμονωδών μεσολαβητών [30].

✓ Ουδετερόφιλα

Αυτά τα κύτταρα θεωρείται ότι προκαλούν άμεση βλάβη στις κυψελίδες [31]. Από ιστολογικές μελέτες παρατηρήθηκαν συσσωματώματα ουδετερόφιλων στους πνεύμονες ασθενών με ARDS [32]. Μερικά από αυτά τα κύτταρα μεταναστεύουν από τον αγγειακό χώρο στο διάμεσο χώρο και μετά στον κυψελιδικό χώρο. Τα ουδετερόφιλα μπορούν να προκαλέσουν βλάβη στους πνεύμονες διαμέσου πολλών μηχανισμών, όπως με την έκκριση του περιεχομένου των λυσοσωμάτων τους και των προϊόντων οξείδωσης που απελευθερώνουν μετά την ενεργοποίησή τους [33,34]. Η συσσώρευση των ουδετερόφιλων σχετίζεται με την ενεργοποίησή τους [35]. Αυξημένες συγκεντρώσεις προϊόντων έκκρισης των ουδετερόφιλων έχουν ανιχνευθεί στο πλάσμα ασθενών με ARDS [36].

✓ Μακροφάγα

Τα μακροφάγα, τα οποία βρίσκονται στον κυψελιδικό χώρο και στον διάμεσο χώρο μεταξύ ενδοθηλίου και κυψελιδικού επιθηλίου, είναι ικανά να προκαλέσουν σημαντικές βλάβες τοπικά, όπως και τα ουδετερόφιλα. Περιέχουν ποικιλία αποικοδομητικών ενζύμων και απελευθερώνουν προϊόντα οξειδωσης. Μπορούν να προσλάβουν ένζυμα, τα οποία ελευθερώνονται από άλλα είδη κυττάρων και να τα χρησιμοποιήσουν για αποικοδόμηση διαφόρων ουσιών [37]. Εκτός από την άμεση βλάβη που μπορούν να προκαλέσουν, μπορούν να συμμετέχουν και στην απελευθέρωση φλεγμονωδών μεσολαβητών, όπως μεταβολίτες του αραχιδονικού οξέος, IL-1, IL-8, TNF-α και ιντερφερόνες [38,39].

Λιποπολυσακχαρίτες (ή ενδοτοξίνες)

Οι λιποσακχαρίτες (LPS) φαίνεται ότι μπορεί να είναι παράγοντες πυροδότησης του ARDS. Έχει διαπιστωθεί η παρουσία τους σε υψηλά επίπεδα σε ασθενείς με ARDS [40]. Μπορούν να προκαλέσουν πνευμονική βλάβη με διάφορους τρόπους [41]. Το πιο πιθανό όμως είναι να δρουν σε συνεργασία με άλλους παράγοντες. Μπορούν να επάγουν την απελευθέρωση κυτοκινών από διάφορα κύτταρα, αυξάνοντας έτσι την απόκριση των ουδετερόφιλων και /ή των μακροφάγων. Παρ' αυτά η παρουσία τους μόνο δεν φαίνεται να είναι επαρκής για να προκληθεί ARDS.

Μεσολαβητές της φλεγμονής

Η ακριβής αλληλουχία των σταδίων στη φλεγμονώδη αντίδραση που οδηγούν σε πνευμονική βλάβη, δεν είναι πλήρως κατανοητή. Έχουν διαπιστωθεί μεταβολές στα επίπεδα των φλεγμονωδών μεσολαβητών που εκκρίνονται από τα κύτταρα, όπως κυτοκίνες, λιπιδικοί μεσολαβητές (PAF, λευκοτριένια, προσταγλανδίνες), οξειδωτικοί παράγοντες, πρωτεάσες, οξείδιο του αζώτου και παράγοντες ανάπτυξης. Μεσολαβητές της φλεγμονής, οι οποίοι ως γνωστόν προσελκύουν ή απελευθερώνονται από φλεγμονώδη κύτταρα, βρέθηκαν σε ορό ασθενών με ARDS [42,43,44]. Είναι, όμως, σχεδόν βέβαιο ότι το ARDS δεν προκαλείται από έναν μόνο μεσολαβητή [45], στοιχείο που ενισχύεται από τη φτωχή θεραπευτική ανταπόκριση των ασθενών σε χορήγηση μεμονομένων ανταγωνιστών των μεσολαβητών.

3. ΜΗΧΑΝΙΚΟΣ ΑΕΡΙΣΜΟΣ

3.1 Γενικά

Ο μηχανικός αερισμός αποτελεί αναπόσπαστο μέρος της βασικής υποστήριξης της αναπνοής στις μονάδες εντατικής θεραπείας. Ήδη από την αρχή της εφαρμογής του αναγνωρίστηκαν δυνητικές επιπλοκές, όπως αυξημένος κίνδυνος πνευμονίας, διαταραχές της καρδιακής λειτουργίας, προβλήματα που σχετίζονται με την καταστολή του ασθενούς. Παρά τη σημαντική πρόοδο στην εντατική θεραπεία η θνητότητα των ασθενών στην οξεία πνευμονική βλάβη (Acute Lung Injury, ALI) αλλά κυρίως του συνδρόμου της οξείας αναπνευστικής δυσχέρειας (Acute Respiratory Distress Syndrome, ARDS) παραμένει υψηλή. Η αρνητική κλινική πορεία αυτών των ασθενών που βρίσκονται σε αναπνευστήρα πιθανολογείται ότι οφείλεται σε βλάβες στον πνεύμονα που ονομάζονται VALI (πνευμονικές βλάβες συνδεόμενες με τον αναπνευστήρα, Ventilator-Associated Lung Injury) και είναι αντίστοιχες των πνευμονικών βλαβών που προκαλούνται πειραματικά σε πειραματόζωα και ονομάζονται VILI (προκαλούμενες από τον αναπνευστήρα πνευμονικές βλάβες, Ventilator Induced Lung Injury). Οι περισσότεροι ασθενείς πεθαίνουν από ανεπάρκεια πολλαπλών οργάνων και όχι από υποξία, όπως θα περίμενε κανείς. Η επικρατέστερη υπόθεση που έχει προταθεί για να εξηγήσει αυτά τα φαινόμενα είναι ότι ο ίδιος ο μηχανικός αερισμός είναι υπεύθυνος όχι μόνο για την επιδείνωση της προϋπάρχουσας πνευμονικής βλάβης, αλλά και για την ανάπτυξη μιας συστηματικής φλεγμονώδους αντίδρασης (SIRS, Systemic Inflammatory Reaction Syndrome) και της ανεπάρκειας πολλαπλών οργάνων (MSOF, MultiSystem Organ Failure) [46]. Η μηχανική αναπνοή πιθανώς μπορεί να δώσει το έναυσμα μιας φλεγμονώδους απόκρισης, η οποία στη συνέχεια ενισχύεται και εξαπλώνεται με τρόπο χαρακτηριστικό για τη μεταγωγή των σημάτων σε διάφορα βιολογικά φαινόμενα.

3.2 Μηχανικός αερισμός

Στην ηρεμία ή την άσκηση οι πνεύμονες διατηρούν φυσιολογικά επίπεδα της μερικής πίεσης του οξυγόνου στο αρτηριακό αίμα (PaO_2) και της μερικής πίεσης του διοξειδίου του άνθρακα στο αρτηριακό αίμα ($PaCO_2$). Στην κλινική πράξη θεωρείται ότι υπάρχει αναπνευστική ανεπάρκεια όταν σε ηρεμία η $PaO_2 < 60$ mmHg και η $PaCO_2 > 50$ mmHg και ενώ ο ασθενής αναπνέει σε αέρα δωματίου.

Ο μηχανικός αερισμός συνήθως εφαρμόζεται μέσω ενδοτραχειακού σωλήνα. Το ποσό του αέρα που χορηγείται, ο χρόνος εισπνοής και εκπνοής καθώς και ο

όγκος του αναπνεόμενου αέρα με τους αναπνευστήρες είναι χαρακτηριστικά που ρυθμίζονται. Ο μηχανικός αερισμός χρησιμοποιείται συνήθως για δύο λόγους:

1. Για τον έλεγχο της PaCO_2 και την αύξηση της PaO_2 . Σε ασθενή που δεν είναι δυνατόν να γίνει ικανοποιητική οξυγόνωση δίχως επικίνδυνη αύξηση της PaCO_2 ή σε ασθενή που η PaCO_2 είναι υψηλή επειδή δεν ανασαίνει, η εφαρμογή μηχανικού αερισμού αυξάνει τον κυψελιδικό αερισμό και μειώνει την PaCO_2 . Αν εφαρμόζεται σωστά ξεκουράζει και τους αναπνευστικούς μυς. Η εφαρμογή μηχανικού αερισμού είναι απαραίτητη όταν υπάρχει κόπωση των αναπνευστικών μυών που μπορεί να ευθύνεται για την αύξηση της PaCO_2 .

2. Μηχανικός αερισμός μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να αυξήσει την PaO_2 όταν αυτή δεν αυξάνει ικανοποιητικά με τη χορήγηση O_2 . Αυτό γίνεται όταν υπάρχει διαφυγή αέρα (Shunt) από δεξιά προς τα αριστερά. Η συχνότερη αιτία Shunt είναι η ύπαρξη υγρού στις κυψελίδες ή η ύπαρξη κολαψαρισμένων κυψελίδων όπως γίνεται στο πνευμονικό οίδημα. Σε αυτές τις καταστάσεις η εφαρμογή θετικής τελοεκπνευστικής πίεσης (PEEP) γίνεται με τον αναπνευστήρα. Κατά την εφαρμογή τέτοιας πίεσης η πίεση στις κυψελίδες διατηρείται μεγαλύτερη της ατμοσφαιρικής συνεχώς. Όταν υπάρχουν κυψελίδες κολαψαρισμένες ή γεμάτες με υγρό η εφαρμογή της PEEP φαίνεται ότι ανοίγει αυτές τις αναπνευστικές μονάδες με αποτέλεσμα να αυξάνει ο τελοεκπνευστικός όγκος αέρα με κατάληξη την αύξηση της PaO_2 . Η εκλογή της ορθής τιμής της θετικής πίεσης είναι σημαντικός παράγοντας που καθορίζει το αν θα επιτευχθεί τελικά ικανοποιητική PaO_2 . Σπάνια υπερβαίνει τα 10 cm H_2O [47,48].

3.3 Δυνάμεις που ασκούνται στον πνεύμονα

Χαρακτηριστικές είναι οι διατμητικές τάσεις που ασκούνται στον πνεύμονα κατά τη ροή του αέρα στους αεραγωγούς. Η επιφανειακή τάση επίσης, επηρεάζει τη διατασιμότητα (compliance) του πνεύμονα, καθώς και την αντίσταση στους μικρούς αεραγωγούς. Οι δυνάμεις επιφανειακής τάσης επηρεάζουν άμεσα τη σταθερότητα και την ομοιόμορφη διάταση του κυψελιδικού δικτύου στους πνεύμονες.

Επιφανειακή τάση

Το κύριο μέρος του στατικού έργου της αναπνοής προέρχεται από την έκπτυξη των κυψελιδικών αερόσacων έναντι των δυνάμεων επιφανειακής τάσης. Η ενέργεια που ασκείται ανά μονάδα επιφάνειας ονομάζεται επιφανειακή τάση και στη συνέχεια στην εργασία θα εννοείται η τάση που ασκείται στη μεσόφαση αέρα-υγρού. Τα μόρια του επιφανειοδραστικού παράγοντα που παράγουν τα πνευμονοκύτταρα τύπου II,

οργανώνονται στη μεσόφαση αέρα-υγρού και επηρεάζουν την επιφανειακή τάση. Η υγρή φάση η οποία υποστηρίζει το λεπτό υμένιο του επιφανειοδραστικού παράγοντα συχνά αναφέρεται και ως υπόφαση. Ένα λεπτό υμένιο επιφανειοδραστικού παράγοντα πάντα μειώνει την επιφανειακή τάση σε τιμές χαμηλότερες από αυτές που προσδιορίζονται χωρίς την παρουσία του επιφανειοδραστικού παράγοντα. Επίσης μειώνει την ανισορροπία δυνάμεων, επειδή οι ελκτικές δυνάμεις μεταξύ των μορίων του επιφανειοδραστικού παράγοντα και των μορίων του υγρού είναι μικρότερες από τις ελκτικές δυνάμεις μεταξύ των μορίων του υγρού. Εάν τα μόρια του επιφανειοδραστικού παράγοντα είχαν μεγαλύτερη έλξη για τα μόρια του υγρού από την έλξη μεταξύ τους, τότε αναγκαστικά θα διαλύονταν και εξ' ορισμού δε θα διέθεταν επιφανειοδραστική ικανότητα.

Οι μεταβολές της επιφανειακής τάσης (T) στη μονοστιβάδα λιπιδίων του επιφανειοδραστικού παράγοντα συχνά περιγράφονται με όρους επιφανειακής πίεσης (Pressure, P). Η επιφανειακή πίεση P είναι ίση με το ποσό της μείωσης της επιφανειακής τάσης σε μία μονοστιβάδα του επιφανειοδραστικού παράγοντα. Μαθηματική η επιφανειακή πίεση ορίζεται ως εξής:

$$P = T_0 - T$$

όπου

T_0 : η επιφανειακή τάση της καθαρής υγρής υπόφασης χωρίς την παρουσία επιφανειοδραστικού παράγοντα και

T : η επιφανειακή τάση με την παρουσία υμενίου επιφανειοδραστικού παράγοντα

Παρότι η επιφανειακή τάση και η επιφανειακή πίεση μετρούνται με τις ίδιες μονάδες, έχουν όμως αντίθετη κατεύθυνση. Όταν η επιφανειακή τάση είναι υψηλή, η επιφανειακή πίεση είναι χαμηλή και αντιστρόφως. Οι αριθμητικές τιμές της επιφανειακής πίεσης P κυμαίνονται μεταξύ 0 και T_0 . Για το νερό ή το φυσιολογικό ορρό, το T_0 είναι περίπου 70 mN/m στους 37 °C. Όταν η $P=0$ τότε σημαίνει ότι δεν έχει συμβεί καμία μείωση της επιφανειακής τάσης, κατάσταση η οποία υπάρχει σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις του επιφανειοδραστικού παράγοντα. Σε ακραία κατάσταση η τιμή του $P=T_0$ και σημαίνει πως η επιφανειακή τάση έχει μειωθεί στο μηδέν από τη μονοστιβάδα του επιφανειοδραστικού παράγοντα. Η μέγιστη μείωση παρατηρείται όταν η μονοστιβάδα βρίσκεται στην πιο συμπιεσμένη της μορφή, κατά την οποία το πακετάρισμα των μορίων του επιφανειοδραστικού παράγοντα είναι όσο το δυνατόν πιο συμπαγές και η συγκέντρωση των μορίων του επιφανειοδραστικού παράγοντα στη μονοστιβάδα είναι μέγιστη [49].

3.4 Μηχανικές καταπονήσεις στον πνεύμονα και στα κύτταρα

Στον πνεύμονα ασκούνται τρία είδη βασικών μηχανικών καταπονήσεων:

α) Μηχανική στρέβλωση σε ασθενείς με άσθμα κατά το βρογχόσπασμο. Η σύσπαση των λείων μυϊκών ινών στους αεραγωγούς δημιουργεί μια δύναμη συμπίεσης στους βλεννογόνους και αυτό έχει ως αποτέλεσμα την αναδίπλωση του επιθηλίου των αεραγωγών και μείωση της επιφάνειάς τους.

β) Διατμητικές τάσεις. Αυτές προκαλούνται:

- όταν ρευστά, όπως το αίμα ή ο αέρας κινούνται κατά μήκος μιας επιφάνειας με κύτταρα. Τότε δημιουργείται μία τάση παράλληλη προς την πλασματική μεμβράνη των κυττάρων, η οποία προκαλεί μια παραμόρφωση κατά την επαφόμενη της. Τέτοιες τάσεις αναπτύσσονται στους αεραγωγούς, από τη ροή αέρα και στα αγγεία λόγω της ροής του αίματος.
- από διάφορες παθοφυσιολογικές καταστάσεις στις κυψελίδες όταν έχουμε σχηματισμό οιδήματος.

Κατά τη μηχανική υποστήριξη της αναπνοής με θετική πίεση, οι κυψελίδες υποχρεώνονται να μεταπίπτουν κυκλικά και ταχέως από την κατάσταση της συρρίκνωσης και της πλημμυρίδας με υγρό κατά την εκπνοή σε κατάσταση διάτασης και πληρότητας με αέρα κατά την εισπνοή. Αυτό δημιουργεί σημαντικές διατμητικές τάσεις διότι συμβαίνει συνεχής ανακατανομή οιδήματος.

γ) Μηχανική παραμόρφωση (mechanical strain). Τροπή αναπτύσσεται όταν ασκηθεί δύναμη σε ελαστικό κύτταρο οπότε προκαλείται **μηχανική διάταση (mechanical stretch)** (εφελκυσμός), ή παραμορφωτική στρέβλωση (distortion). Αν και πολλοί υποστηρίζουν ότι οι κυψελίδες τείνουν να αυξήσουν την επιφάνειά τους κατά την εισπνοή ξεδιπλώνοντας τις πτυχώσεις μάλλον παρά εφελκύνοντας τις κυψελίδες, όμως ακόμη και στην περίπτωση αυτή, οι τάσεις που ασκούνται από τον πλευρικό χώρο, μεταφέρονται από τον πνεύμονα στα κυψελιδικά τοιχώματα κατά την ελαστική επαναφορά. Σε παθοφυσιολογικές καταστάσεις, όπως το σύνδρομο οξείας αναπνευστικής δυσχέρειας του ενήλικα (ARDS), έχουμε αύξηση της ελαστικής επαναφοράς, οι δυνάμεις αυτές αυξάνουν και κατά συνέπεια η τροπή μεταβάλλεται.

Επιπλέον, εντός των κυττάρων ασκούνται *δυνάμεις εφελκυσμού* και μπορεί να προκαλέσουν μεταβολές στον κυτταροσκελετό (π.χ. από τη συστολή της ακτίνης) που επιδρούν σε όλο το κύτταρο, συμπεριλαμβανομένου του πυρήνα.

Κατά την αναπνοή, οι τάσεις που προκαλούν την παραμόρφωση είναι πιο έντονες στα κύτταρα του κυψελιδικού τοιχώματος και του επιθηλίου, ενώ οι διατμητικές τάσεις επιδρούν στα τοιχώματα των αγγείων, μειούμενες από το αγγειακό ενδοθήλιο του πνεύμονα προς τα τριχοειδή. Αντίστοιχες δυνάμεις ασκούνται και σε άλλα σημεία

εκτός από το ενδοθήλιο των αγγείων, όπως η επίδραση του πλευριτικού υγρού στα κύτταρα του πλευρικού μεσοθηλίου καθώς και της υγρής υπόφασης στα επιθηλιακά κύτταρα των αεραγωγών και στα επιθηλιακά κύτταρα των κυψελίδων [50].

3.5 Μηχανική διάταση

Η διάταση του πνεύμονα και η χαλάρωση κατά την αναπνοή προκαλούν παραμόρφωση των κυττάρων. Επιπρόσθετα, με τη διατμητικότητα (shear stress) ο όγκος του αέρα και η ροή των υγρών επίσης δημιουργούν πιέσεις οι οποίες διατείνουν τα τοιχώματα των αεραγωγών και των αιμοφόρων αγγείων. Ωστόσο, αρκετές συσκευές έχουν σχεδιαστεί να προκαλούν αυτή τη μηχανική διέγερση στα πνευμονικά κύτταρα. Αυτές μπορεί να κατανεμηθούν σε διαφορετικές ομάδες ανάλογα με το είδος της φυσικής δύναμης.

Στατική διάταση (Static Stretch)

Παρόλο που ο πνεύμονας υποβάλλεται σε κυκλική διάταση με παλμική ροή αέρα και αίματος κατά τη διάρκεια της αναπνοής, η στατική διάταση που γίνεται άπαξ θεωρείται πάρα πολύ απλή για να περιγράψει την *in vivo* διάταση. Έχει το πλεονέκτημα ότι αλλαγές στη μορφολογία των κυττάρων, στη διακίνηση ιόντων ασβεστίου και άλλα ενδοκυττάρια σήματα μπορεί να παρατηρηθούν απευθείας στο μικροσκόπιο.

Κυκλική Διάταση (Cyclic Stretch)

Μία εμπορικά διαθέσιμη συσκευή, η Flexercell, έχει χρησιμοποιηθεί ευρύτατα για να προκαλέσει κυκλική παραμόρφωση πολλών κυττάρων, όπως εμβρυϊκών, οστικών και μυϊκών. Σε αυτή τη συσκευή χρησιμοποιείται αντλία κενού με την οποία προκαλείται παραμόρφωση της ελαστικής μεμβράνης προς τα κάτω. Η μεμβράνη μπορεί να καλυφθεί με μία σειρά χημικών και εξωκυττάρων υλικών (extracellular matrix, ECM) Η προβλεπόμενη παραμόρφωση απλώνεται σε όλη την ελαστική μεμβράνη της συσκευής [51].

Πολλές είναι οι συσκευές που έχουν χρησιμοποιηθεί για την εφαρμογή διάτασης σε κύτταρα του πνεύμονα [52,53]. Οι Wirtz & Dobbs [54] παρατήρησαν ότι η επιφάνεια των κυττάρων ήταν μικρότερη σε σχέση με την επιφάνεια της μεμβράνης των κυττάρων που είχαν δεχθεί την επίδραση στατικής διάτασης. Κατά τη διάταση πιθανόν να έχουν σπάσει δεσμοί μεταξύ των κυττάρων.

Η παραμόρφωση των κυττάρων αλλά και του υποστρώματος όπου έχουν τοποθετηθεί έχει μελετηθεί και συσχετιστεί. Η παραμόρφωση που εφαρμόζεται στα

κύτταρα δεν είναι πάντα ισοδύναμη με αυτή που εφαρμόζεται στο υπόστρωμα και έχει υπολογιστεί ότι είναι περίπου 60 % αυτής που εφαρμόζεται στο υπόστρωμα [55]. Το ποσοστό της παραμόρφωσης εξαρτάται από το είδος της διάτασης αλλά και το είδος των κυττάρων. Για παράδειγμα, σε ινοβλάστες -που απομονώθηκαν από καρδιά αρουραίου- που καλλιεργήθηκαν σε τρυβλία και τοποθετήθηκαν σε συσκευή διαξονικής παραμόρφωσης, βρέθηκε ότι η παραμόρφωσή τους συσχετίζεται πολύ καλά με την παραμόρφωση του υποστρώματος [56]. Αντίθετα, σε μία παρόμοια συσκευή ετοιμάστηκαν επιθηλιακά πνευμονικά κύτταρα ενήλικα αρουραίου και διαπιστώθηκε ότι η παραμόρφωση ήταν δυσδιάκριτη σε σχέση με την παραμόρφωση του υποστρώματος όπου είχαν [57].

3.6 Επίδραση των μηχανικών καταπονήσεων στα κύτταρα του πνεύμονα

Διαφοροποίηση πνευμονοκυττάρων τύπου II σε τύπου I

Τα μηχανικά σήματα ρυθμίζουν τη μετάβαση και τη διατήρηση του φαινότυπου των κυττάρων τύπου II σε κύτταρα τύπου I στο κυψελιδικό επιθήλιο. Έτσι έχει αναφερθεί σε εμβρυικά εμφυτεύματα πνεύμονα, που έχουν προέλθει από ζώο που έχει διασωληνωθεί, μία μείωση του αριθμού των κυττάρων τύπου II που οφείλεται σε φαινόμενα διαφοροποίησης των κυττάρων τύπου II σε τύπου I. Επίσης, σε *in vitro* συνθήκες οι Gutierrez et al έδειξαν ότι σε πρωτογενείς καλλιέργειες πνευμονοκυττάρων τύπου II αρουραίου η εφαρμογή μηχανικής διάτασης για 18 ώρες έδειξε μία αύξηση στην έκφραση δεικτών των κυττάρων τύπου I και μία αντίστοιχη μείωση των κυττάρων τύπου II [58].

Πολλαπλασιασμός

Η μηχανική διάταση έχει βρεθεί ότι επάγει τον πολλαπλασιασμό πνευμονοκυττάρων. Συγκεκριμένα, έχει αναφερθεί ότι η ανάπτυξη της καλλιέργειας της κυτταρικής σειράς IMR-90, (εμβρυϊκοί ινοβλάστες από πνεύμονα ανθρώπου) αυξήθηκε μετά από εφαρμογή κυκλικής διάτασης [59]. Σε *in vivo* συνθήκες για την επίδραση της διάτασης στον πολλαπλασιασμό κυττάρων τύπου II θα πρέπει να συμπεριληφθούν επιπλέον και παράγοντες που ρυθμίζουν την ανάπτυξη του πνεύμονα. Συγκεκριμένα θα πρέπει να επισημαίνονται διάφοροι παράγοντες όπως οι ορμόνες και οι αυξητικοί παράγοντες καθώς επίσης και η αλληλεπίδραση των

κυττάρων τύπου II με άλλα είδη κυττάρων. Για να βρεθούν οι επιθηλιακές αλληλεπιδράσεις, απομονωμένα εμβρυϊκά επιθηλιακά κύτταρα και ινοβλάστες υπεβλήθησαν σε μηχανική διάταση το καθένα χωριστά ή σε συν-καλλιέργειες. Η παραμόρφωση αύξησε τη σύνθεση του δεοξυριβονουκλεϊνικού οξέος (deoxyribonucleic acid, DNA) και στα δύο είδη κυττάρων [60].

Τριχοειδοκυψελιδική διαπερατότητα κυττάρων πνεύμονα

Η διαπερατότητα των πνευμονικών ενδοθηλιακών κυττάρων είναι διαδικασία αυστηρά ελεγχόμενη. Για να μελετηθεί η επίδραση διατμητικών τάσεων σε αρτηριακά επιθηλιακά κύτταρα πνεύμονα βοός, έγινε καλλιέργεια σε διαπερατά μικροσφαιρίδια, τα οποία τοποθετήθηκαν σε στήλες. Το μέγεθος της διατμητικής τάσης ρυθμιζόταν από τη ροή υγρού έκλουσης. Παρατηρήθηκε ότι η διαπερατότητα των κυττάρων αυξανόταν αυξανόμενης της ροής αντιστρεπτά. Αντίστοιχη πειραματική διάταξη εφαρμόστηκε και για τη μελέτη της επίδρασης διατμητικών τάσεων σε μεσοθηλιακά κύτταρα. Τα κύτταρα αυτά αποτελούν φραγμό μεταξύ του πνεύμονα και των γύρω υγρών και ιστών. Υπόκεινται λοιπόν σε σημαντική καταπόνηση κατά την αναπνοή, οπότε διατείνονται και συρρικνώνονται κυκλικά. Κατά την κίνηση αυτή, ορισμένες περιοχές των σπλαχνικών πλευρών διολισθαίνουν έναντι των πλευρικών, που βρίσκονται στο στέρνο. Οι τάσεις λοιπόν που ασκούνται είναι διατμητικές, τα δε μεσοθηλιακά κύτταρα αποκρίνονται σε αυτές.

Απώλεια της ακεραιότητας της κυτταροπλασματικής μεμβράνης

Η διατήρηση της ακεραιότητας της κυτταροπλασματικής μεμβράνης είναι μεγάλης σημασίας. Έχουν περιγραφεί μηχανισμοί που βοηθούν στη διατήρηση της τάσης της μεμβράνης των παραμορφωμένων κυττάρων κάτω από τα επίπεδα που οδηγούν σε λύση. Μελέτες σε πνευμονοκύτταρα τύπου II (ATII) έχουν δείξει ότι η εφαρμογή μηχανικής διάτασης οδηγεί σε αύξηση της κυτταροπλασματικής μεμβράνης για τη διατήρηση της ακεραιότητάς της και την εξασφάλιση της βιωσιμότητας των κυττάρων. Είναι μία διαδικασία που εξαρτάται από τη θερμοκρασία και την παραγωγή ενέργειας και αναστέλλεται από το κρύο, τα χαμηλά επίπεδα χοληστερόλης και από πιθανή βλάβη στο σύστημα διόρθωσης του κυτταροσκελετού [46].

Απόπτωση

Τα πνευμονοκύτταρα τύπου II υφίστανται απόπτωση κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης και της ωρίμανσης του πνεύμονα, διαδικασία που αποτελεί αναπόσπαστο μέρος του φυσιολογικού ρυθμού αναπλήρωσης των κυττάρων. Επίσης, η απόπτωση πυροδοτείται από μηχανικές δυνάμεις σε αρκετά διαφορετικά είδη κυττάρων και σε ιστούς. Η κυκλική διάταση έχει αποδειχθεί ότι επάγει αλλαγές που συμβαίνουν στα κύτταρα τύπου II λόγω απόπτωσης. Αυτές οι αλλαγές περιλαμβάνουν μείωση της βιωσιμότητας των κυττάρων που μετράται ως αύξηση της διαπερατότητας των κυττάρων. Επίσης υπάρχουν ενδείξεις ότι η διάταση επάγει την ενεργοποίηση των κασπασών και την απελευθέρωση του κυτοχρώματος c, κύριων δεικτών της απόπτωσης, στα κύτταρα τύπου II [61].

Φλεγμονώδεις διαβιβαστές

Επιπλέον, με τους προηγούμενους άμεσους δείκτες της απόπτωσης η διέγερση των κυττάρων λόγω διάτασης προκαλεί **1)** απελευθέρωση φλεγμονωδών κυτοκινών και **2)** ενεργοποίηση διαφόρων μηχανισμών σηματοδότησης που εμπλέκονται στην απόπτωση.

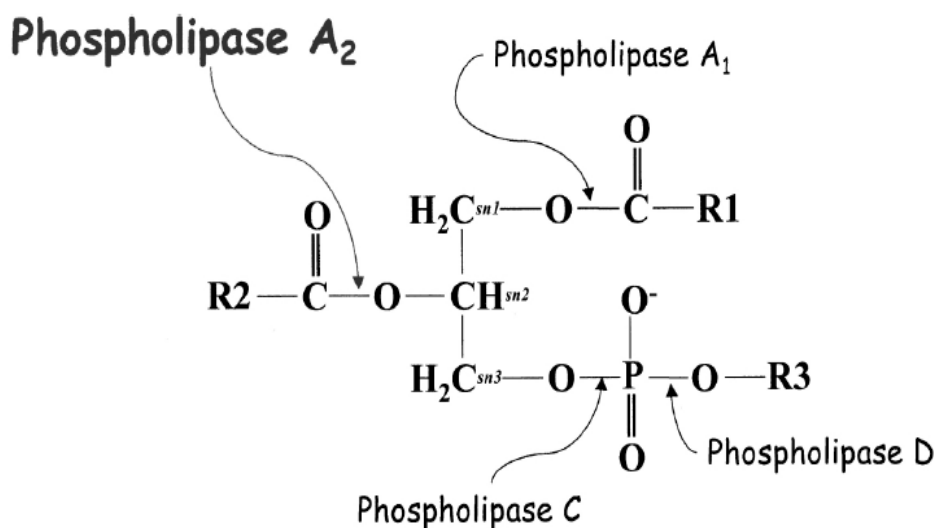
Φλεγμονώδεις παράγοντες που παράγονται σε απόκριση της διάτασης είναι η ιντερλευκίνη-8 (IL-8), οι προστακυκλίνες και η φλεγμονώδης πρωτεΐνη των μακροφάγων (Macrophage Inflammatory Protein-2, MIP-2). Επιπρόσθετα, σε μικρότερο όμως βαθμό, παράγονται ο ογκονεκρωτικός παράγοντας α (TNF-α) και οι ιντερλευκίνες IL-1β, IL-6, [60].

Ενδεικτικά οι Pugin et al ανέπτυξαν ένα *in vitro* μοντέλο στο οποίο απομονωμένα πνευμονοκύτταρα (κυψελιδικά μακροφάγα) υπεβλήθησαν σε συνεχή κυκλική διάταση σε συνθήκες παρόμοιες με αυτές του μηχανικού αερισμού. Συγκεκριμένα σε ένα μοντέλο τεχνητού πνεύμονα το οποίο αποτελείται από μία διατατή πλαστική μεμβράνη, καλλιεργήθηκαν μακροφάγα προκαλώντας αύξηση 12 % της επιφάνειας των κυττάρων και 7 % επιμήκυνση της αρχικής διαμέτρου τους. Χρησιμοποιήθηκαν κυψελιδικά μακροφάγα τα οποία είναι υπεύθυνα για την παραγωγή φλεγμονωδών διαβιβαστών όπως της IL-8, IL-6, της μεταλοπρωτεϊνάσης-9 (matrix metalloproteinase-9). Οι παράγοντες αυτοί μετρήθηκαν στα υπερκείμενα των καλλιιεργειών. Επιπλέον σε αυτές τις πειραματικές συνθήκες βρέθηκε ενεργοποιημένος και ο παράγοντας μεταγραφής κB (NF-κB) [62].

4.ΦΩΣΦΟΛΙΠΑΣΕΣ A₂

4.1 Εισαγωγή

Οι φωσφολιπάσες A₂ (PLases A₂) αποτελούν ένζυμα που καταλύουν την υδρόλυση του εστερικού δεσμού των φωσφολιπιδίων στη θέση sn-2 απελευθερώνοντας λιπαρά οξέα και λυσοφωσφολιπίδια (Σχήμα 4).



Σχήμα 4. Δράση φωσφολιπασών A₁, A₂, C και D.

Οι φωσφολιπάσες διαθέτουν μια ποικιλομορφία όσον αφορά τον τόπο δράσης τους στα φωσφολιπίδια, τον μηχανισμό και τον τρόπο λειτουργίας τους καθώς και την ρύθμισή τους. Παίζουν σημαντικό ρόλο στην συνεχή ανάπτυξη των βιολογικών μεμβρανών και στην παραγωγή του surfactant ενώ τα προϊόντα δράσης τους (ελεύθερα λιπαρά οξέα και λυσοφωσφολιπίδια) συμμετέχουν σε φαινόμενα μεταγωγής σήματος και στην παραγωγή βιολογικά δραστικών λιπιδίων, όπως τα εικοσανοειδή [63,64]. Από την άλλη μεριά υπάρχουν ενδείξεις που υποστηρίζουν ότι αρκετές φωσφολιπάσες επιτελούν τη βιολογική τους λειτουργία ανεξάρτητα της καταλυτικής τους δράσης μέσω πρόσδεσης σε ειδικούς υποδοχείς [65].

4.2 Κατηγορίες φωσφολιπασών A₂

Λαμβάνοντας υπ'όψιν τις βιολογικές ιδιότητες των φωσφολιπασών A₂, τα ένζυμα αυτά μπορούν να καταταχθούν στις παρακάτω κατηγορίες: **1)** τις εκκρινόμενες φωσφολιπάσες A₂ (*secretory phospholipases*, *sPLA₂*), **2)** τις κυτοσολικές φωσφολιπάσες A₂ εξαρτώμενες από ιόντα ασβεστίου (*cytosolic phospholipases*, *cPLA₂*) και **3)** τις ενδοκυττάριας ανεξάρτητες ιόντων ασβεστίου (*intracellular phospholipases*, *iPLA₂*). Εκτός αυτών, υπάρχει και άλλη μια τάξη φωσφολιπασών A₂, **4)** οι γνωστές PAF- ακετυλιδρολάσες (*PAF-acetylhydrolases*, *PAF-AcH*), οι οποίες επιδρούν στον PAF και σε μικρής αλυσίδας φωσφολιπίδια [66,67]. Οι κατηγορίες αυτές διαφέρουν τόσο στη δομή τους, όσο και στην απαίτησή τους για ιόντα ασβεστίου, pH, εξειδίκευση υποστρωμάτων και αναστολείς [68,69].

1) Κυτοσολικές φωσφολιπάσες A₂

Η κυτοσολική φωσφολιπάση A₂ (cPLA₂) είναι ένα ένζυμο με υψηλή μοριακή μάζα, (85 kDa), και έχει βρεθεί στο κυτοσόλιο όλων των κυττάρων που έχουν μελετηθεί μέχρι στιγμής. Όταν ανακαλύφθηκε διαφοροποιήθηκε από τις υπάρχουσες κατηγορίες, που αποτελούνταν από εκκρινόμενες φωσφολιπάσες, λόγω του μεγάλου μοριακού της μεγέθους, την απουσία πολλαπλών δισουλφιδικών δεσμών και την ύπαρξη ενός καταλυτικού υπολείμματος σερίνης. Απαιτεί την παρουσία ιόντων Ca²⁺ σε συγκέντρωση 1μM για τη μέγιστη δράση της και εμφανίζει μεγάλη προτίμηση στο αραχιδονικό οξύ της θέσης sn-2 των φωσφολιπιδίων [70,71,72]. Υπάρχουν ενδείξεις ότι η cPLA₂ συμμετέχει στις διαδικασίες μεταγωγής σήματος με ενεργοποίηση διαμέσου υποδοχέα. Το ένζυμο μετατοπίζεται στις μεμβράνες μετά από απόκριση στην ενδοκυττάρια αύξηση ιόντων Ca²⁺ και ακολουθεί φωσφορυλίωση αυτού μέσω της πρωτεϊνικής κινάσης C (PKC). Έχει παρατηρηθεί ότι η ενεργότητα του ενζύμου αυξάνεται ύστερα από φωσφορυλίωση από MAP κινάσες [73].

2) Εκκρινόμενες φωσφολιπάσες A₂

Οι εκκρινόμενες φωσφολιπάσες A₂ (sPLAases A₂) είναι ένζυμα χαμηλής μοριακής μάζας, περίπου 14 kDa που απαιτούν ιόντα Ca²⁺ σε συγκέντρωση millimolar (mM) για τη δράση τους. Χαρακτηρίζονται από ένα διατηρημένο μοτίβο που περιέχει καταλυτικά υπολείμματα ιστιδίνης και από τη χαρακτηριστική τριτοταγή τους δομή, η οποία παρέχει στα ένζυμα αυτά σταθερότητα κατά της πρωτεόλυσης και αντίσταση στη μετουσίωση, έτσι ώστε να επιτρέπεται η διατήρηση της ενεργότητάς τους στα εξωκυττάρια υγρά όπου και βρίσκονται. Σε αντίθεση με την κυτοσολική, οι εκκρινόμενες φωσφολιπάσες A₂ δεν εμφανίζουν κάποια προτίμηση για αραχιδονικό

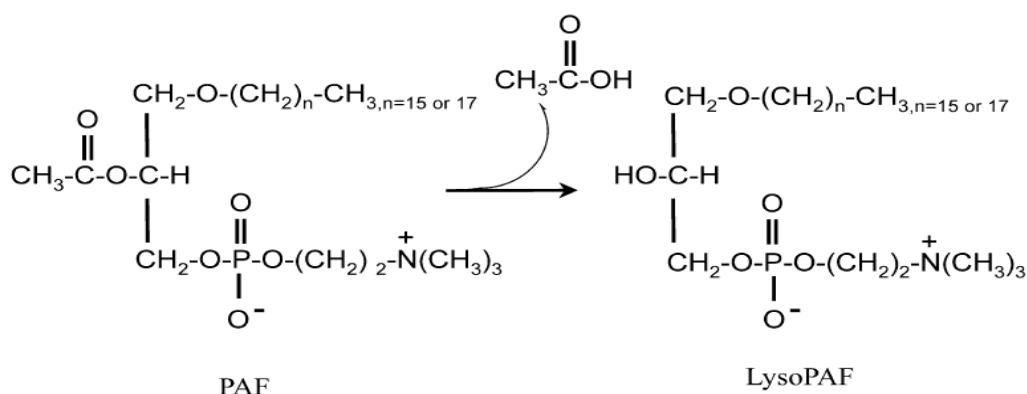
οξύ στην sn-2 θέση των φωσφολιπιδίων. Οι sPLA₂ διαφοροποιούνται μεταξύ τους όσο αφορά τη δομή και την κατανομή τους στους ιστούς [74]. Μέχρι στιγμής έχουν αναγνωριστεί 6 διαφορετικά είδη εκκρινόμενων φωσφολιπασών A₂ και έχουν ταξινομηθεί σε διαφορετικές κατηγορίες (IB, IIA, IID, IIE, V και X). Οι εκκρινόμενες φωσφολιπάσες A₂ λαμβάνουν μέρος σε μια πληθώρα παθολογικών διαδικασιών μέσω απελευθέρωσης αραχιδονικού οξέος από τα μεμβρανικά φωσφολιπίδια, οδηγώντας έτσι στην παραγωγή φλεγμονωδών λιπιδικών μεσολαβητών όπως προσταγλανδίνες, θρομβοξάνια και λευκοτριένια. Επίσης, έχουν αναφερθεί ειδικοί για τις sPLA₂ υποδοχείς, υποδηλώνοντας μη ενζυμικές λειτουργίες των ενζύμων αυτών στην κυτταρική σηματοδότηση [65].

3) Ενδοκυττάρια ανεξάρτητη ιόντων ασβεστίου φωσφολιπάση A₂

Ενδοκυττάρια φωσφολιπάσες A₂ έχουν βρεθεί σε όλους τους ιστούς και κύτταρα. Ωστόσο, ο ρόλος τους στον έλεγχο της λειτουργίας των κυττάρων δεν έχει διευκρινιστεί επαρκώς. Η iPLA₂ έχει ομοιότητες με την cPLA₂ όσο αφορά το μέγεθος (80 kDa), τον ενδοκυττάριο εντοπισμό και ίσως ορισμένα στοιχεία του καταλυτικού μηχανισμού. Δεν εμφανίζει προτίμηση σε αραχιδονικό οξύ και θεωρείται ότι είναι από τα πλέον κύρια ένζυμα που εμπλέκονται στην πορεία ανάπτυξης των φωσφολιπιδίων. Η iPLA₂ δεν έχει απαίτηση ιόντων ασβεστίου.

4) PAF-ακετυλυδρολάσες

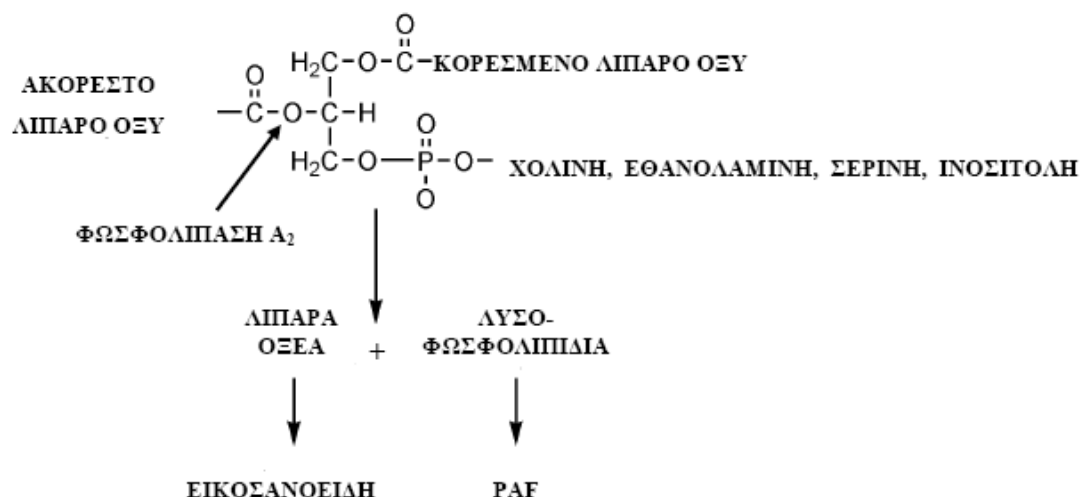
Ο παράγοντας ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων (*platelet activating factor*, PAF) είναι ένα αλκυλοφωσφολιπίδιο με ακετυλομάδα στην sn-2 θέση και έχει την ιδιότητα να εμπλέκεται σε μεγάλο πλήθος παθολογικών και φυσιολογικών καταστάσεων. Η ακετυλομάδα στην sn-2 θέση είναι απαραίτητη για τη βιολογική δράση του ενζύμου και η υδρόλυση του PAF επιφέρει απώλεια της βιολογικής του δραστηριότητας. Η αντίδραση αυτή καταλύεται από το ένζυμο PAF-ακετυλυδρολάση (PAF-AcH) (Σχήμα 5). Η PAF-AcH υπάρχει σε ενδοκυττάρια και εξωκυττάρια ισομορφές: Ia, Ib και II. Η ισομορφή Ia είναι ένα ετεροδιμερές ένζυμο με υπομονάδες 29-30 kDa. Η ισομορφή Ib είναι ένα ετεροτριμερές ένζυμο με υπομονάδες 29, 30 και 45 kDa που συμβολίζονται αντίστοιχα γ, β και α. Διακρίνονται από την υψηλή συγγένεια για υδρόλυση του PAF και την αδυναμία τους να υδρολύσουν προπιοσυλο- ή βουτυρυλο- αλυσίδες στην sn-2 θέση. Η ισομορφή II είναι ένα πολυπεπτίδιο 40 kDa (συμβολίζεται ως α) και έχει την ικανότητα να υδρολύει οξειδωμένη PC.



Σχήμα 5. Δράση της PAF-AcH στον παράγοντα ενεργοποίησης αιμοπεταλίων (PAF)

4.3 Δράση φωσφολιπασών A₂

Η βιοσύνθεση του PAF και των εικοσανοειδών μοιράζονται ένα κοινό ενζυμικό βήμα, την απελευθέρωση του αραχιδονικού οξέος από την sn-2 θέση των μεμβρανικών φωσφολιπιδίων [75], άμεσο αποτέλεσμα της δράσης της φωσφολιπάσης A₂. Ακόμα και κύτταρα σε ηρεμία, υφίσταται μια μικρού εύρους υδρόλυση ως μέρος της διαδικασίας ανάπτυξης των μεμβρανικών φωσφολιπιδίων. Τα περισσότερα λιπαρά οξέα που απελευθερώνονται σε αυτήν την κατάσταση, μετατρέπονται σε λυσο-φωσφολιπίδια για την αναγέννηση φωσφολιπιδικών μορίων. Σε αντίθεση, η παραγωγή φλεγμονωδών μεσολαβητών σχετίζεται με ενεργή υδρόλυση φωσφολιπιδίων, ως απόκριση σε κάποιον κυτταρικό αγωνιστή. Η απόκριση αυτή σε κάποιο ερέθισμα, περιλαμβάνει την ενεργοποίηση οδών μεταγωγής σήματος και βιοσύνθεση αγγελιοφόρων, οι οποίοι με τη σειρά τους ενεργοποιούν την PLA₂. Τα πρωταρχικά προϊόντα της υδρολυτικής αντίδρασης, τα λυσο-φωσφολιπίδια και το αραχιδονικό οξύ, αποτελούν πρόδρομα μόρια για την παραγωγή PAF και εικοσανοειδών αντίστοιχα (**Σχήμα 6**).



Σχήμα 6. Δράση της φωσφολιπάσης A₂. Το ένζυμο υδρολύει μεμβρανικά φωσφολιπίδια προς σχηματισμό λιπαρών οξέων και λυσο-φωσφολιπιδίων, τα οποία αποτελούν πρόδρομες ενώσεις των εικοσανοειδών και του PAF αντίστοιχα.

Η απελευθέρωση του αραχιδονικού οξέος ακολουθείται από τη μετατροπή του σε εικοσανοειδή μέσω διαφορετικών μεταβολικών οδών. Οι δυο πιο μελετημένες οδοί είναι αυτοί της κυκλοξυγενάσης (COX) και της 5-λιποξυγενάσης (5-LO) [76]. Η COX επιδρά στο αραχιδονικό οξύ για το σχηματισμό ασταθών ενδοπεροξειδίων προσταγλανδίνης, τα οποία μετατρέπονται σε PGH₂ και στη συνέχεια μπορούν να μετατραπούν σε περαιτέρω προστανοειδή, όπως PGE₂, PGI₂, PGD₂. Από την άλλη μεριά η 5-λιποξυγενάση, είναι ένα ένζυμο που απαιτεί ιόντα ασβεστίου και ενεργοποιείται μέσω ATP. Η επίδρασή του στο αραχιδονικό οξύ έχει σαν αποτέλεσμα τη δημιουργία του 5-υδροπεροξυεικοσατετραενοϊκού οξέος (5-HPETE). Το ασταθές αυτό μόριο, μπορεί να αναχθεί σε υδροξυ-παράγωγα (5-HETE) ή εναλλακτικά μπορεί να μεταβολιστεί περαιτέρω από την 5-LO για την δημιουργία ενός ακόμα ασταθούς μορίου, του LTA₄ [77,78]. Το μόριο αυτό αποτελεί το υπόστρωμα για τα τελικά ένζυμα της οδού των λευκοτριενίων [79,80]. Τα λευκοτριένια και οι προσταγλανδίνες έχουν εμπλακεί σε μια πληθώρα παθολογικών καταστάσεων, όπως στο άσθμα, φλεγμονή, καρκινογένεση [81,82].

4.4 Ρύθμιση ενεργοποίησης κυτοσολικής φωσφολιπάσης A₂

Η cPLA₂ απαιτεί ιόντα ασβεστίου για την ενεργοποίησή της. Σε αντίθεση όμως με την sPLA₂ τα ιόντα αυτά είναι απαραίτητα για την πρόσδεση της cPLA₂ στην μεμβράνη και όχι για την κατάλυση αυτή καθαυτή. Τα επίπεδα της cPLA₂ είναι σταθερά σε κύτταρα σε ηρεμία και σε συγκέντρωση ιόντων ασβεστίου 50-100 mM. Αύξηση στα επίπεδα ασβεστίου επιφέρει μεταφορά του ενζύμου στην μεμβράνη. Έχει πλέον τεκμηριωθεί ότι η απελευθέρωση του αραχιδονικού οξέος προκαλείται στα κύτταρα από πολλούς αγωνιστές που κινητοποιούνται από ιόντα ασβεστίου [83].

Ένας άλλος τρόπος ενεργοποίησης της cPLA₂ είναι μέσω φωσφορυλίωσής της. Έχει επιβεβαιωθεί πειραματικά η φωσφορυλίωση κατάλοιπων σερίνης της cPLA₂ μέσω αγωνιστή και η αύξηση της ενεργότητας του ενζύμου στα ενεργοποιημένα κύτταρα αποδίδεται σε φωσφορυλίωση της σερίνης 505 (Ser 505) μέσω MAPK [84]. Η cPLA₂ διαθέτει μια περιοχή φωσφορυλίωσης από MAPK και η φωσφορυλίωση αυτής της περιοχής από τις MAPK p42 ή p44 αυξάνει την ενεργότητα της cPLA₂ [85,86]. Άλλες κινάσες όπως η PKC και η PKA μπορούν επίσης να επιτελέσουν τον ίδιο σκοπό. Η ενεργοποίηση της PKC είναι πιθανό να διαδραματίζει τον ρόλο της με το να αποτελεί το εναρκτήριο σήμα για την ενεργοποίηση ενός καταρράκτη κινασών οδηγώντας τελικά στην ενεργοποίηση των MAPK [87]. Μέχρι στιγμής δεν υπάρχουν ενδείξεις για άμεση φωσφορυλίωση της cPLA₂ από την PKC, υπάρχουν όμως ενδείξεις για φωσφορυλίωση κατάλοιπων τυροσίνης, τα οποία εξαρτώνται από τον τύπο του κυττάρου και την φύση του ερεθίσματος [88].

4.5 Ρύθμιση ενεργοποίησης εκκρινόμενης φωσφολιπάσης A₂

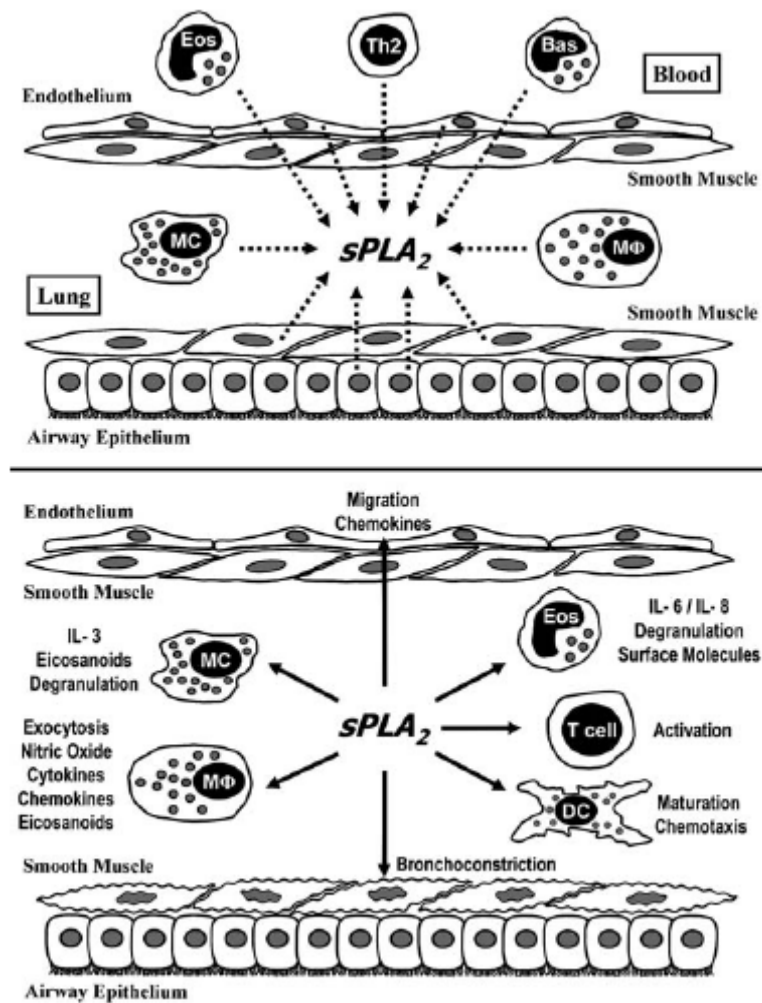
Μέχρι πρόσφατα, ως κύρια δράση της sPLA₂ θεωρούνταν η ικανότητά της να παρέχει υποστρώματα για τη βιοσύνθεση φλεγμονωδών λιπιδικών μεσολαβητών. Ωστόσο, νεώτερες μελέτες υπέδειξαν εναλλακτικούς μηχανισμούς δράσης της sPLA₂ που σχετίζονται με την ικανότητά της να ενεργοποιεί φλεγμονώδη κύτταρα οδηγώντας στην παραγωγή φλεγμονωδών μεσολαβητών διαφορετικών των εικοσανοειδών [89]. Αυτές οι λειτουργίες δεν σχετίζονται τόσο με την ενζυμική ενεργότητα της sPLA₂ όσο με αλληλεπιδράσεις της με ειδικούς υποδοχείς που εκφράζονται στα κύτταρα στόχους [90]. Τέτοιες αλληλεπιδράσεις έχουν σαν αποτέλεσμα την ενεργοποίηση της σηματοδότησης στα φλεγμονώδη κύτταρα μέσω παραγωγής δευτέρων αγγελιοφόρων, φωσφορυλίωσης κινασών, ενεργοποίησης μεταγραφικών παραγόντων. Για παράδειγμα, η sPLA₂ επάγει την εξωκύτωση ανθρώπινων μακροφάγων [91], ουδετερόφιλων [92] και ηωσινόφιλων [93], καθώς και

την παραγωγή μονοξειδίου του αζώτου (NO) [94] και κυτοκινών όπως η IL-6 [95]. Οι διεργασίες αυτές φαίνεται να είναι ανεξάρτητες της ενζυμικής ενεργότητας της sPLA₂ και σχετίζονται με μηχανισμούς μέσω υοδοχείων.

Στα περισσότερα φλεγμονώδη κύτταρα, το μεγαλύτερο ποσοστό του ενδοκυττάριου αραχιδονικού οξέος που μετατρέπεται σε εικοσανοειδή παρέχεται κυρίως από την cPLA₂ [96]. Ωστόσο, οι sPLA₂s συνεισφέρουν στην παραγωγή αραχιδονικού οξέος μέσω διάφορων μηχανισμών. Κάποιες από αυτές (GIA, GIII, GV και GX) έχουν την ικανότητα να υδρολύουν αραχιδονικό οξύ από τα μεμβρανικά φωσφολιπίδια με πρόσδεσή τους στην εξωτερική στοιβάδα των κυττάρων [97]. Εναλλακτικά, sPLA₂s που κατέχουν περιοχές πρόσδεσης ηπαρίνης (GIIA, GIID, και GV), μπορούν να αλληλεπιδρούν με προτεογλυκάνες θειϊκής ηπαράνης, οι οποίες είναι άφθονες σε εξειδικευμένες μεμβρανικές περιοχές γνωστές ως λιπιδικές σχεδίες (lipid rafts) [98]. Έτσι, σε ένα ενεργοποιημένο κύτταρο, αυτές οι sPLA₂s συγκεντρώνονται σε περιορισμένα διαμερίσματα εμπλουτισμένα σε φωσφολιπίδια με αραχιδονικό οξύ. Αυτό το μονοπάτι των πρωτεογλυκανών επιτρέπει στις sPLA₂s να έρθουν σε στενή επαφή με άλλα ένζυμα, όπως κυκλοξυγενάση (COX) και 5-λιποξυγενάση, δημιουργώντας κατάλληλες συνθήκες για την αποτελεσματική παραγωγή εικοσανοειδών. Ένας τρίτος μηχανισμός με τον οποίο οι sPLA₂s συνεισφέρουν στην κινητοποίηση αραχιδονικού οξέος περιλαμβάνει αυξορύθμιση της ενεργότητας, της έκφρασης ή και των δύο άλλων ενζύμων που εμπλέκονται στη σύνθεση εικοσανοειδών. Σε ουδετερόφιλα [99] οι GIB, GIIA, και GV sPLA₂s δημιουργούν ενδοκυττάρια σήματα, που οδηγούν σε ενεργοποίηση της cPLA₂ και ακόλουθη παραγωγή εικοσανοειδών. Οι παραπάνω παρατηρήσεις υποδεικνύουν πως οι sPLA₂s έχουν κάποιο ρόλο στη σύνθεση των εικοσανοειδών. Παρόλο που η συνεισφορά τους είναι μικρότερη από εκείνη της cPLA₂, μπορεί να είναι σημαντική για την έναρξη ή την ενίσχυση της παραγωγής εικοσανοειδών στα ενεργοποιημένα φλεγμονώδη κύτταρα. Επιπροσθέτως, παρόλο που οι sPLA₂s δείχνουν μικρή ή και καμία προτίμηση στο αραχιδονικό οξύ, είναι αποτελεσματικές στο να υδρολύουν άλλα λιπαρά οξέα στη θέση sn-2 των φωσφολιπιδίων, παράγοντας λυσοφωσφολιπίδια. Καταστάσεις όπως το βρογχικό άσθμα, στις οποίες οι sPLA₂s απελευθερώνονται σε ένα εξωκυττάριο περιβάλλον πλούσιο σε φωσφολιπίδια (surfactant), συνδυάζονται με την παρουσία μεγάλων ποσοτήτων φωσφολιπιδίων [100]. Αυτά τα μόρια ασκούν πολλαπλές επιδράσεις στα φλεγμονώδη κύτταρα ενεργοποιώντας υποδοχείς των G-πρωτεϊνών και παρέχοντας υποστρώματα για τη σύνθεση του PAF [101]. Επομένως, η παραγωγή λυσοφωσφολιπιδίων αποτελεί άλλον ένα μηχανισμό με τον οποίο οι sPLA₂s συμμετέχουν στη φλεγμονή κατά το άσθμα.

Υπό φυσιολογικές συνθήκες, τα επίπεδα της sPLA₂ στους ιστούς είναι χαμηλά. Σε καταστάσεις φλεγμονής όμως αυξάνονται δραματικά. Έχει βρεθεί ότι η έκφραση της sPLA₂ αυξάνεται μετά από επίδραση βακτηριακών τοξινών, οι οποίες επιφέρουν έκκριση του ενζύμου στις περιοχές της φλεγμονής. Τα υψηλά επίπεδα του ενζύμου συνδυάζονται πλέον με διάφορες φλεγμονώδεις ασθένειες. Η αύξηση των επιπέδων της sPLA₂ σε αυτές τις περιπτώσεις οφείλεται σε συστατικά των βακτηρίων, κυρίως του LPS, ο οποίος και προάγει την σύνθεση και έκκριση του ενζύμου σε διαφορετικά κύτταρα και ιστούς και διαφορετικά πειραματικά μοντέλα φλεγμονωδών νοσημάτων [102]. Ωστόσο, ο μηχανισμός ο οποίος προάγει την σύνθεση της sPLA₂ λόγω επίδρασης του LPS είναι εξειδικευμένος για κάθε κύτταρο και σχετίζεται επίσης με το πειραματικό μοντέλο που χρησιμοποιείται κάθε φορά. Υπάρχουν έμμεσα στοιχεία τα οποία υποδεικνύουν την επίδραση κυτοκινών, όπως ο TNF-α και IL-1β στην σύνθεση sPLA₂ μετά από επίδραση LPS.

Οι βιολογικές επιδράσεις των sPLA₂s που σχετίζονται με την παθογένεση φλεγμονωδών ασθενειών στον πνεύμονα συνοψίζονται στο παρακάτω σχήμα (Σχήμα 7) [89].



Σχήμα 7. Σχηματική αναπαράσταση των κυτταρικών πηγών των sPLA₂s στους ανθρώπινους αεραγωγούς και των επιδράσεων των sPLA₂s σε κύτταρα που σχετίζονται με την παθογένεση ασθενειών του πνεύμονα [89].

Eos: Eosinophil, Bas: Basophil, MC: Mast Cells, MΦ: Macrophage.

4.6 Διασταύρωση εκκρινόμενης και κυτοσολικής φωσφολιπάσης A₂

Σύμφωνα με τελευταίες μελέτες η παραγωγή αραχιδονικού οξέος στα κύτταρα είναι αποτέλεσμα της συνεργασίας τόσο της cPLA₂ όσο και της sPLA₂. Το σημαντικότερο γεγονός είναι η ενεργοποίηση της cPLA₂ μέσω διαφορετικών σημάτων, όπως διεργασίες φωσφορυλίωσης [103,104], αύξηση των επιπέδων του ενδοκυττάριου ασβεστίου [105,106] και πιθανώς και των επιπέδων του φωσφατιδυλινωσιτίδιου 4,5 διφωσφατιδίου (*phosphatidyl inositol 4,5 bisphosphate*) [107]. Η συγχρονισμένη ενεργοποίηση όλων αυτών των οδών μπορεί να επιφέρει μια παρατεταμένη ενεργοποίηση της cPLA₂. Σε κύτταρα τα οποία δεν εκφράζουν εκκρινόμενες φωσφολιπάσες, το μεγαλύτερο ποσοστό της παραγωγής του αραχιδονικού οξέος κατά την κυτταρική ενεργοποίηση προέρχεται από την cPLA₂. Ωστόσο, σε κύτταρα τα οποία έχουν την ικανότητα σύνθεσης sPLA₂ η απελευθέρωση του αραχιδονικού οξέος φαίνεται να εξαρτάται από αυτό το ένζυμο και όχι από την cPLA₂ [108,109]. Άλλο ένα στοιχείο είναι ότι πολλά κύτταρα τα οποία μπορούν να παράγουν εικοσανοειδή είναι επίσης σε θέση να βιοσυνθέσουν και να εκκρίνουν sPLA₂.

Επίδραση αναστολέα της cPLA₂ σε ουδετερόφιλα επιφέρει σημαντική μείωση στην παραγωγή LTB₄ μέσω της επίδρασης της sPLA₂ τύπου V [110]. Σε αυτό το μοντέλο η sPLA₂ τύπου V η οποία εκκρίνεται από φλεγμονώδη κύτταρα όπως ιστιοκύτταρα και μακροφάγα επιδρά άμεσα στην εξωτερική μεμβράνη των ουδετερόφιλων για την απελευθέρωση λιπαρών οξέων, συμπεριλαμβανομένων και του αραχιδονικού οξέος, και λυσοφωσφολιπίδια, πιθανώς λύσο-φωσφατιδυλοχολίνη. Τα λιπαρά οξέα και η λύσο-φωσφατιδυλοχολίνη επάγουν την μεταφορά στην μεμβράνη των 5-LO και cPLA₂ που συνοδεύονται και από αύξηση των επιπέδων του ενδοκυττάριου ασβεστίου, ενώ το αραχιδονικό οξύ αποτελεί τον πρόδρομο για την παραγωγή των εικοσανοειδών. Η ενεργοποίηση της 5-LO θα προάγει εν συνεχεία την απελευθέρωση του LTB₄, ο οποίος θα προσδεθεί στον αντίστοιχο υποδοχέα του και θα επιφέρει την κινητοποίηση των MAP κινασών και την ενεργοποίηση της cPLA₂.

4.7 Φωσφολιπάση A₂ και πνεύμονες

Οι φωσφολιπάσες A₂ παίζουν σημαντικό ρόλο στην παθογένεση ή στη διαιώνιση της φλεγμονής στον πνεύμονα, γεγονός που επηρεάζει άμεσα την ισορροπία του επιφανειοδραστικού παράγοντα.

Κυτοσολικές, εκκρινόμενες και ανεξάρτητες ιόντων ασβεστίου φωσφολιπάσες A₂ έχουν ανιχνευθεί σε πνεύμονες. Σε πνευμονοκύτταρα τύπου II έχει βρεθεί μια μορφή

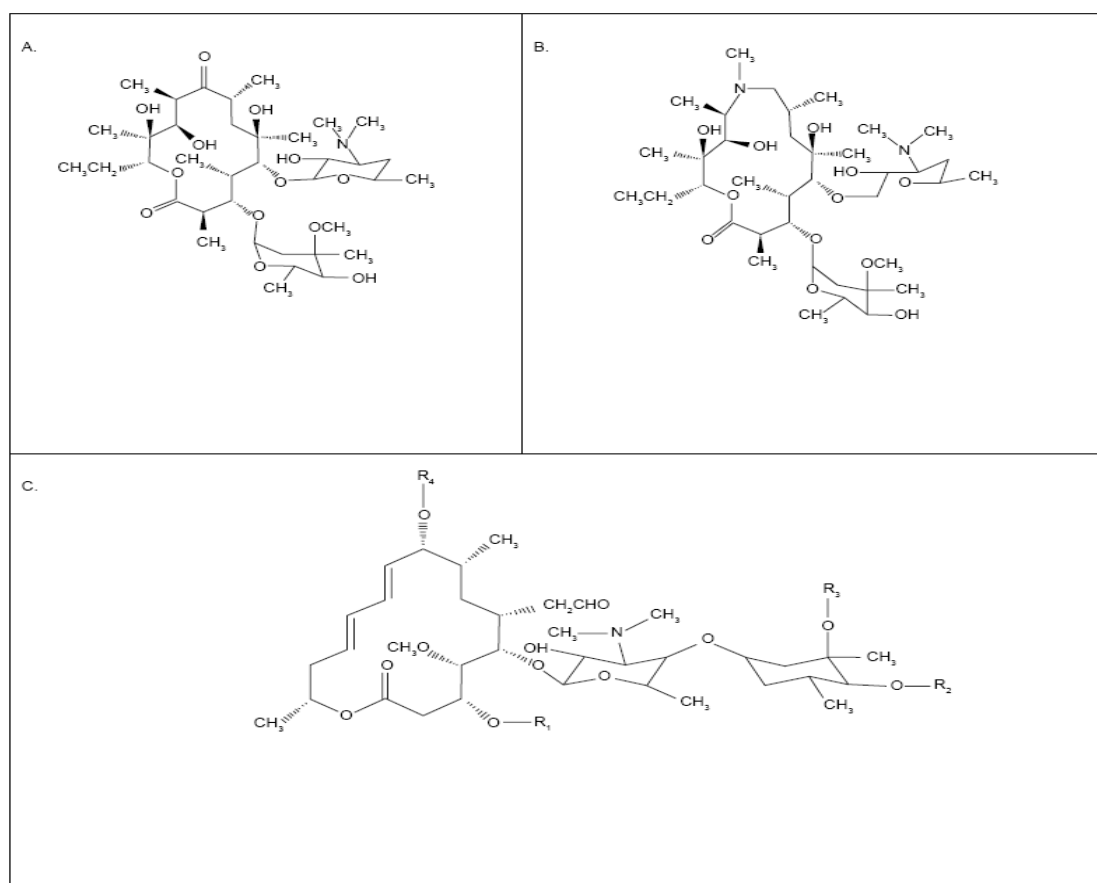
κυτοσολικής φωσφολιπάσης, η οποία φαίνεται να έχει εξειδίκευση στο αραχιδονικό οξύ και μεταφέρεται από το κυτοσόλιο στη μεμβράνη. Η μεταφορά αυτή είναι εξαρτώμενη από ιόντα ασβεστίου και στην κυτταρική σειρά μακροφάγων RAW264.7 ρυθμίζεται από πρωτεϊνικές κινάσες [111, 112]. Οι sPLA₂ και cPLA₂ έχουν βρεθεί σε BAL και μακροφάγα αντίστοιχα. Αυξημένα επίπεδα εκκρινόμενης PLA₂ έχουν βρεθεί στο BAL ασθενών με άσθμα, ενώ τα ηωσινόφιλα από ίδιους ασθενείς έχουν μεγαλύτερη συγκέντρωση αραχιδονικού οξέος από τα αντίστοιχα του αίματος [113]. Τα κυψελιδικά μακροφάγα αποτελούν την κύρια sPLA₂-IIA σε πειραματικά μοντέλα οξείας πνευμονικής βλάβης [114].

Επίσης, ανιχνεύθηκε κυτοσολική και λυσοσωμική ενεργότητα φωσφολιπάσης A₂ σε ενεργοποιημένα κυψελιδικά μακροφάγα βοός. Η λυσοσωμική ενεργότητα χαρακτηρίστηκε όξινη και ανεξάρτητη ιόντων ασβεστίου [115].

5. ΜΑΚΡΟΛΙΔΙΑ

5.1 Γενικά

Τα μακρολίδια αποτελούν μια οικογένεια ευρέως φάσματος αντιμικροβιακών. Αποτελούνται από έναν μεγάλο δακτύλιο λακτόνης στον οποίο συνδέονται ένα ή και περισσότερα σάκχαρα με γλυκοζιτικούς δεσμούς [116]. Ο δακτύλιος της λακτόνης μπορεί να περιέχει 14, 15 ή και 16 σκέλη (**Σχήμα 8**). Χαρακτηριστικά παραδείγματα αποτελούν η ερυθρομυκίνη, η ροξιθρομυκίνη και η κλαριθρομυκίνη όπου ανήκουν στην ομάδα με τα 14 σκέλη καθώς και η αζιθρομυκίνη χαρακτηριστικό μέλος της ομάδας με τα 15 σκέλη. Τα μακρολίδια έχουν την ιδιότητα να αναστέλλουν την πρωτεϊνική σύνθεση των βακτηρίων μέσω πρόσδεσης στην 50S ριβοσωμική υπομονάδα τους. Είναι δραστικά τόσο απέναντι στα κατά gram θετικά όσο και στα κατά gram αρνητικά βακτήρια ενώ ταυτόχρονα ρυθμίζουν την παραγωγή τοξικών βακτηριακών παραγόντων και τοξινών [117, 118].



Σχήμα 8. Μοριακή δομή μακρολιδίων με 14 σκέλη (ερυθρομυκίνη A), με 15 σκέλη (αζιθρομυκίνη B) και με 16 σκέλη (C) [117].

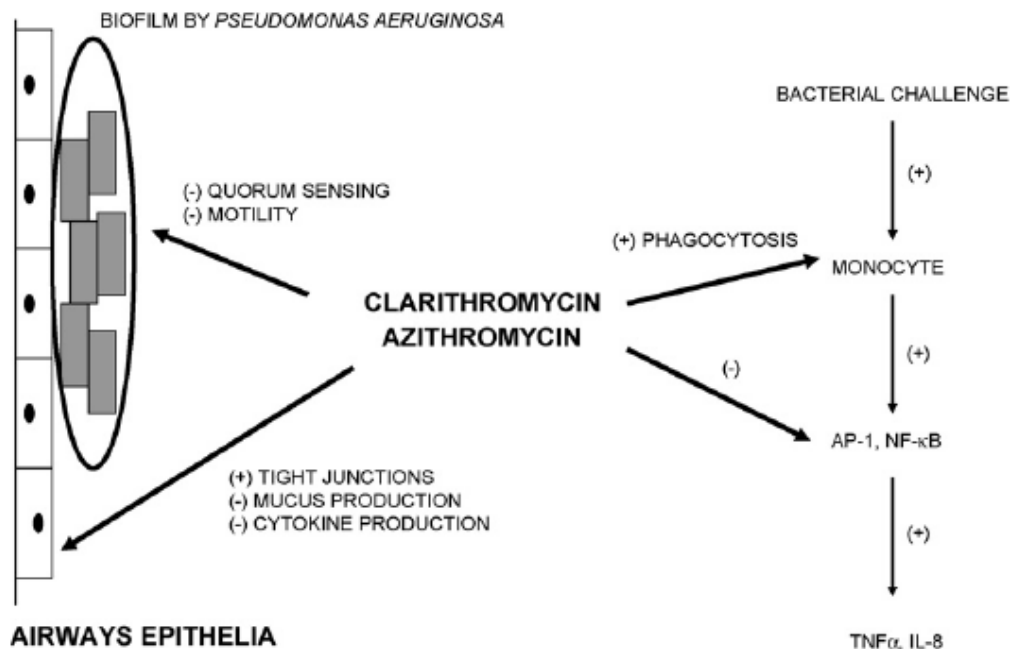
Τα τελευταία χρόνια υπήρξαν στοιχεία που υποδεικνύουν πως μέρος της δράσης των μακρολιδίων δεν οφείλεται στην παραδοσιακή αντιμικροβιακή τους ικανότητα. Αυτή η ιδέα δημιουργήθηκε από τη χρήση των μακρολιδίων στην αντιμετώπιση της διάχυτης πανβρογχιολίτιδας (diffuse panbronchiolitis DPB). Η DPB είναι μια χρόνια καταστρεπτική δυσλειτουργία η οποία χαρακτηρίζεται από φλεγμονή των βρόγχων και συνοδεύεται από χρόνια αναπνευστική ανεπάρκεια. Το ποσοστό θανάτου από αυτή την ασθένεια ήταν πολύ υψηλό. Όταν το 1979 η ερυθρομυκίνη προτάθηκε ως η κύρια θεραπεία, οδήγησε στην παράταση της επιβίωσης και τη σημαντική μείωση του ποσοστού θανάτου [119]. Οι ασθενείς αυτοί έχουν στους αεραγωγούς αποικισμούς από το βακτήριο *Pseudomonas aeruginosa*, το οποίο οδηγεί σε επαναλαμβανόμενους κύκλους επιδείνωσης και ύφεσης. Το *Pseudomonas aeruginosa* όμως δεν ανήκει στο αντιμικροβιακό φάσμα των μακρολιδίων, γεγονός που δημιούργησε πολλά ερωτηματικά σχετικά με τον τρόπο δράσης τους στην DPB. Η αντιφλεγμονώδης δράση τους ήταν η πιο πιθανή εξήγηση γι' αυτό το φαινόμενο [120]. Στη συνέχεια επιβεβαιώθηκε και από άλλες μελέτες με αποτέλεσμα σήμερα τα μακρολίδια να χρησιμοποιούνται για τη θεραπεία χρόνιων πνευμονικών ασθενειών όπως άσθμα, κυστική ίνωση, βρογχίτιδα [121].

5.2 Αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες των μακρολιδίων

Το ανοσοποιητικό σύστημα είναι ένα πολυσύνθετο, λειτουργικό και πλεονάζων σύστημα με μη γραμμικές αναδρασικές αλληλεπιδράσεις όπου έχει χαρακτηριστεί μαθηματικά ως χάος [122]. Η ικανότητα των μακρολιδίων να συσσωρεύονται στα κύτταρα ξενιστές, συμπεριλαμβανομένων των φαγοκυττάρων και των επιθηλιακών κυττάρων, ίσως παίζει κάποιο ρόλο στη ρύθμιση των κυτταρικών λειτουργιών από τα μόρια αυτά. Η συσσώρευση αυτή μπορεί να μεταβάλλεται ανάλογα με το μακρολίδιο που χρησιμοποιείται και τον τύπο του κυττάρου [123]. Σύμφωνα με πρόσφατες μελέτες τα μακρολίδια που ανήκουν στις τάξεις με τα 14 και τα 15 σκέλη μπορούν να διευκολύνουν σημαντικά τη διάλυση της φλεγμονής. Για παράδειγμα, η κλαριθρομυκίνη και η αζιθρομυκίνη έχουν την ικανότητα να αυξάνουν τη φαγοκυττάρωση αποπτωτικών επιθηλιακών κυττάρων και ουδετερόφιλων από μακρόφαγα [124,125]. Αυτή η λειτουργία φαγοκυττάρωσης παρουσιάζεται εξασθετισμένη στην περίπτωση της Χρόνιας Αποφρακτικής Πνευμονοπάθειας (Chronic Obstructive Pulmonary Disease COPD) και επιδεινώνει τη χρόνια φλεγμονή στην ασθένεια αυτή [126,127].

5.2.1 Επίδραση στα επιθηλιακά κύτταρα

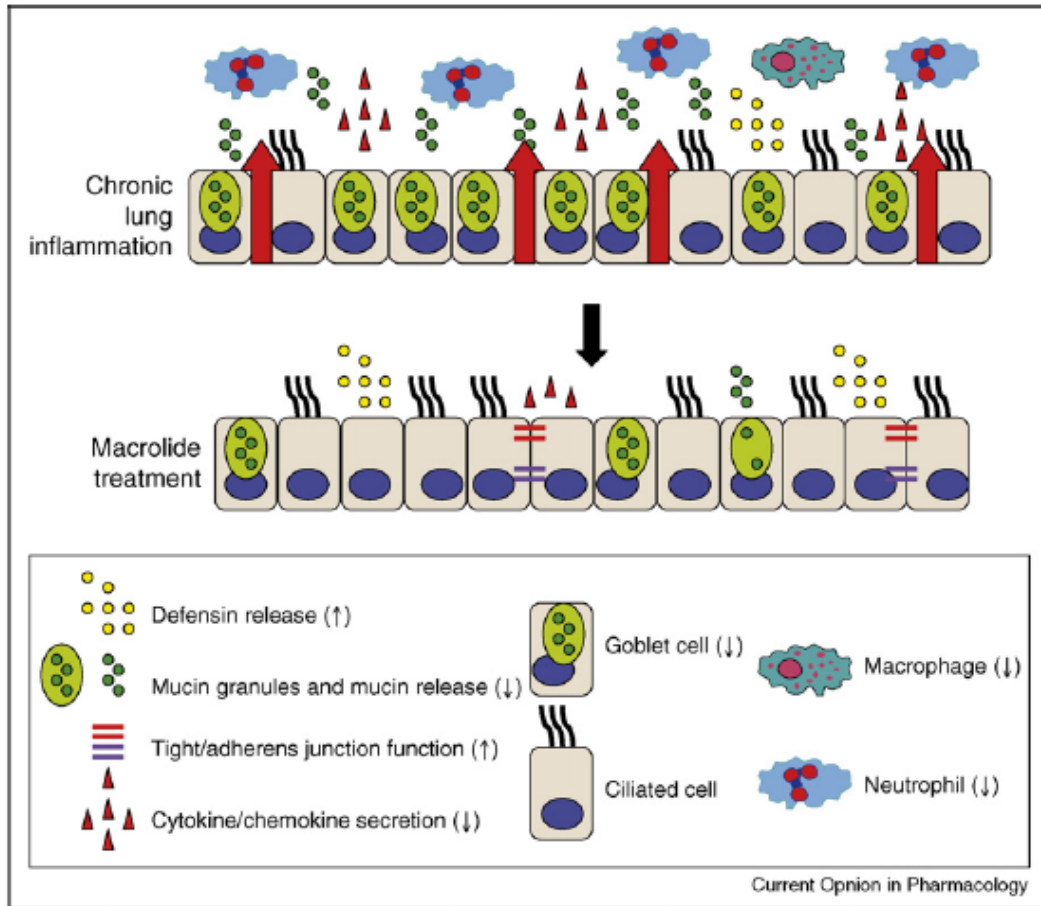
Πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει την επίδραση των μακρολιδίων στα επιθηλιακά κύτταρα. Συγκεκριμένα, η αζιθρομυκίνη φαίνεται να προκαλεί σημαντική μείωση στην έκκριση του TNFα και την παραγωγή της IL-8 στα κύτταρα IB3-1CF [128]. Επίσης, σε κύτταρα A549 που είχαν ενεργοποιηθεί με TNFα, η κλαριθρομυκίνη προκάλεσε αναστολή της δράσης του NF-κΒ [129]. Αυτά τα ευρήματα υποδεικνύουν ότι τα μακρολίδια ρυθμίζουν τη φλεγμονώδη ενεργότητα στα επιθηλιακά κύτταρα του πνεύμονα πιθανόν σε επίπεδο αντιγραφής γονιδίων για φλεγμονώδεις κυτοκίνες (Σχήμα 9) [130].



Σχήμα 9. Σχηματική αναπαράσταση της αντι-φλεγμονώδους δράσης των μακρολιδίων. -: αναστολή, +: διέγερση, AP-1: activator protein-1, NF-κB: nuclear factor-κB, TNFα: tumour necrosis factor-alpha, IL-8: interleukin-8 [130].

5.2.2 Επίδραση στην άμυνα του επιθηλίου

Η βλάβη του επιθηλίου αποτελεί σημαντικό χαρακτηριστικό στο άσθμα, στη χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια (COPD), και σε άλλες φλεγμονώδεις πνευμονικές ασθένειες. Η διατήρηση της ακεραιότητας και της σωστής λειτουργίας του επιθηλίου είναι ζωτικής σημασίας για την προστασία από οποιαδήποτε μορφής φλεγμονή στο άσθμα και τη COPD [131, 132]. Τα επιθηλιακά κύτταρα όπως και οι εκκρίσεις βλέννας σχηματίζουν ένα φυσικό και χημικό φράγμα, παρέχοντας με αυτό τον τρόπο στον πνεύμονα μία πρώτη γραμμή άμυνας κατά των παθογόνων. Αυτό το ανατομικό και ανοσολογικό επιθηλιακό φράγμα περιλαμβάνει την εδραίωση συμπλόκων συμβολής μεταξύ των κυττάρων, τον καθορισμό της πολικότητας των επιθηλιακών κυττάρων, καθώς και την παραγωγή βλέννας και αντιμικροβιακών και επιφανειοδραστικών ουσιών. Στην περίπτωση βλάβης, ακολουθεί γρήγορη εδραίωση ενός προγράμματος από συντονισμένες αποκρίσεις που περιλαμβάνει μετανάστευση και πολλαπλασιασμό με σκοπό την επιδιόρθωση του ιστού που έχει υποστεί βλάβη. Επίσης, τα επιθηλιακά κύτταρα οργανώνουν τη φλεγμονώδη απόκριση στους αεραγωγούς και ρυθμίζουν τη στρατολόγηση των φλεγμονωδών κυττάρων, μέσω της παραγωγής κυτοκινών και της έκφρασης ειδικών υποδοχέων. Τέλος, συμμετέχουν στην εκκαθάριση των αεραγωγών από μικροοργανισμούς, μέσω μηχανισμών που περιλαμβάνουν στρατολόγηση ουδετερόφιλων, παραγωγή αντιμικροβιακών ουσιών και απόπτωση μολυσμένων επιθηλιακών κυττάρων [133]. Η επίδραση των μακρολιδίων στη διατήρηση της ακεραιότητας του επιθηλίου φαίνεται στο παρακάτω **Σχήμα 10** [118].



Σχήμα 10. Χρήσιμες επιδράσεις των μακρολιδίων στην ακεραιότητα και τη σωστή λειτουργία του επιθηλίου. Στις χρόνιες φλεγμονώδεις πνευμονικές ασθένειες, παρατηρείται αύξηση στη διαπερατότητα του επιθηλίου εξαιτίας της βλάβης και της αναδιοργάνωσης των κυτταρικών διασυνδέσεων (αναπαρίστανται στο σχήμα με μεγάλα κόκκινα βέλη), διεύρυνση ουδετερόφιλων κατά ένα μέρος λόγω σημάτων που παράγονται από τα επιθηλιακά κύτταρα, και παρατηρείται αυξημένη απελευθέρωση φλεγμονωδών μεσολαβητών και βλέννας στους αεραγωγούς. Η υπερέκκριση βλέννας συμβάλλει στη διαίωνιση της φλεγμονής και/ή της μόλυνσης στους αεραγωγούς, οδηγώντας σε χρόνια επιθηλιακή βλάβη. Τα μακρολίδια μπορούν να συμβάλλουν στην επιδιόρθωση της λειτουργίας του επιθηλίου βελτιώνοντας τις διακυτταρικές συνδέσεις και τις αντιμικροβιακές λειτουργίες και μειώνοντας την παραγωγή κυτοκινών και βλέννας. Επίσης, μπορούν να βελτιώσουν την ικανότητα φαγοκύτωσης των κυψελιδικών μακροφάγων, μειώνοντας με αυτό τον τρόπο τον αριθμό των φλεγμονωδών κυττάρων στους αεραγωγούς, οδηγώντας έτσι στη διάλυση της φλεγμονής. Τα βέλη (↑↓) δηλώνουν την κατεύθυνση των αλλαγών που επάγονται από τη χρήση των μακρολιδίων στους διαφορετικούς μεσολαβητές [118].

5.2.3 Επίδραση στις πρωτεΐνες της βλέννας

Η βλέννα αποτελεί την πρώτη γραμμή άμυνας των αεραγωγών και αποτελείται από νερό, πρωτεΐνες, φωσφολιπίδια και πεπτίδια που εκκρίνονται από τα επιθηλιακά κύτταρα. Σε πολλές ασθένειες του πνεύμονα, όπως άσθμα, χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια κλπ, οποιαδήποτε μεταβολή στο επιθήλιο έχει σαν αποτέλεσμα διαταραχές στη σύσταση και τις ιδιότητες της βλέννας, διευκολύνοντας με αυτό τον τρόπο τη χρόνια μόλυνση και φλεγμονή [134]. Κλινικά δεδομένα υποδεικνύουν ότι τα μακρολίδια έχουν την ιδιότητα να ρυθμίζουν την παραγωγή και την έκφραση των πρωτεϊνών της βλέννας. Συγκεκριμένα, η κλαριθρομυκίνη αναστέλλει την έκκριση βλεννίνης που επάγεται από TNFα στα NCI-H292 κύτταρα καθώς και σε πρωτογενείς καλλιέργειες επιθηλιακών κυττάρων [135]. Επίσης, το ίδιο αντιβιοτικό βρέθηκε να αναστέλλει την παραγωγή της πρωτεΐνης muc5ac σε ποντίκια που είχαν μολυνθεί από το βακτήριο *P. Aeruginosa*, και μάλιστα η σηματοδότηση σε αυτό μοντέλο ήταν εξαρτώμενη από την κινάση ERK [136].

Οι πρωτεΐνες που εκκρίνονται από τα βακτήρια μπορούν να επάγουν την έκκριση βλέννας στο επιθήλιο. Οι πρωτεΐνες αυτές είναι μικρά, διάχυτα μόρια που εμπλέκονται στη βακτηριδιακή ρύθμιση της μεταγραφής, στην κυτταρική σηματοδότηση και διαφοροποίηση [137,138]. Η αζιθρομυκίνη αναστέλλει την παραγωγή της πρωτεΐνης MUC5AC που επάγεται από το βακτήριο *P. Aeruginosa* στην επιθηλιακή κυτταρική σειρά NCI-H292 [139]. Ο μηχανισμός ρύθμισης της MUC5AC περιλαμβάνει ενεργοποίηση των ERK και NF-κΒ μονοπατιών, υποδηλώνοντας την επίδραση των μακρολιδίων στα σηματοδοτικά μονοπάτια στις πρωτογενείς καλλιέργειες επιθηλιακών κυττάρων. Παρόλο που οι περισσότερες μελέτες έχουν εστιάσει στην MUC5AC (την κυριότερη πρωτεΐνη της βλέννας), η επίδραση των μακρολιδίων στην παραγωγή και έκφραση μπορεί να επεκταθεί και σε άλλες πρωτεΐνες. Για παράδειγμα, η ροξιθρομυκίνη μειώνει την έκφραση της πρωτεΐνης MUC2 σε πρωτογενείς καλλιέργειες επιθηλιακών κυττάρων και η επίδραση αυτή περιλαμβάνει αναστολή της NF-κΒ σηματοδότησης [140]. Με βάση όλα αυτά τα δεδομένα, η ανασταλτική επίδραση των μακρολιδίων στην υπερ-έκκριση βλέννας μπορεί να εξηγηθεί με την ανοσορυθμιστική τους δράση.

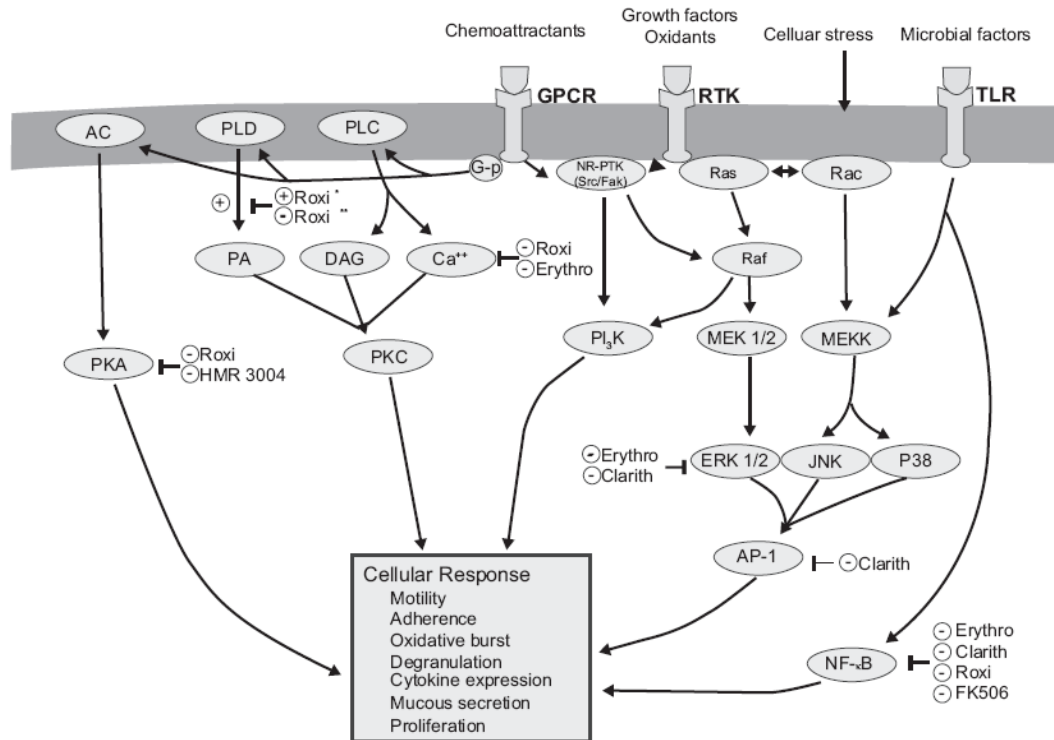
5.2.4 Επίδραση στη μετακίνηση ιόντων

Η μετακίνηση των ιόντων κατά μήκος του επιθηλίου είναι απαραίτητη διότι ρυθμίζει την ενυδάτωση και το ύψος της ρευστής στοιβάδας. Η κυστική ίνωση είναι μια γενετικά κληρονομική δυσλειτουργία που οφείλεται σε μεταλλάξεις πρωτεϊνών του καναλιού ιόντων χλωρίου. Αυτές οι μεταλλάξεις προκαλούν διαταραχές στη σύσταση των ηλεκτρολυτών στο εξωκυττάριο ρευστό που περιβάλλει το επιθήλιο των αεραγωγών, με αποτέλεσμα να επιτρέπει στο βακτήριο *P. Aeruginosa* να δημιουργεί χρόνιες αποικίες και επαναλαμβανόμενες επιδεινώσεις. Τόσο το κανάλι ιόντων χλωρίου όσο και εκείνο των ιόντων νατρίου είναι ζωτικής σημασίας για τη μετακίνηση ιόντων στους αεραγωγούς και τη μεταφορά νερού. Στην επιφάνεια των αεραγωγών ο όγκος του υγρού ρυθμίζεται από οσμωτικές δυνάμεις στο επιθήλιο που περιλαμβάνουν απορρόφηση νατρίου και έκκριση χλωρίου, και μετακίνηση νερού η οποία ακολουθεί τη ροή των ιόντων [122]. Δυσλειτουργία σε αυτή την επιθηλιακή μετακίνηση των ιόντων συσχετίζεται με διαταραχές στη λειτουργία της βλέννας στην κυστική ίνωση και τη χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια. Κάποιες μελέτες σε ασθενείς με κυστική ίνωση έδειξαν βελτίωση στην αγωγιμότητα μετά από θεραπεία με αζιθρομυκίνη [141], ενώ σε βρογχικά επιθηλιακά κύτταρα BEAS-2B παρατηρήθηκε ρύθμιση της μετακίνησης ιόντων χλωρίου, η οποία οδήγησε σε μείωση της έκκρισης βλέννας, μετά από κατεργασία με ερυθρομυκίνη [142]. Από την άλλη μεριά κάποιες άλλες μελέτες έδειξαν ότι η κλαριθρομυκίνη και η αζιθρομυκίνη δεν είχαν καμία επίδραση στη μετακίνηση των ιόντων τόσο σε μοντέλα ποντικών όσο και σε ασθενείς με κυστική ίνωση [143]. Γενικά οι απόψεις στο θέμα αυτό είναι αντικρουόμενες και απαιτούν περαιτέρω μελέτη.

5.3 Συνοπτικά

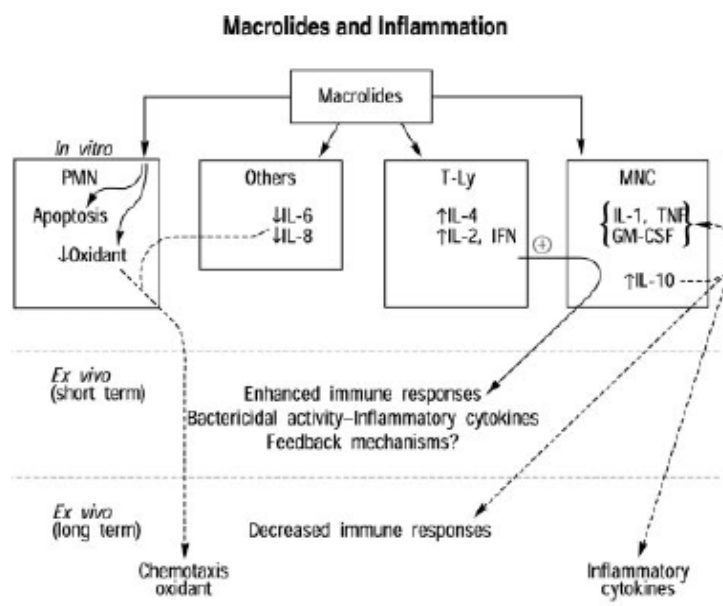
Όλες οι μελέτες που αναφέρθηκαν περιγράφουν τα μακρολίδια ως ουσίες, που πέραν των παραδοσιακών αντιμικροβιακών ιδιοτήτων, παρουσιάζουν αξιόλογες αντιφλεγμονώδεις επιδράσεις. Οι επιδράσεις αυτές αφορούν μεγάλο εύρος κυττάρων, όπως βρογχικά επιθηλιακά κύτταρα, κυψελιδικά μακροφάγα, μονοκύτταρα, ηωσινόφιλα, ουδετερόφιλα και λεμφοκύτταρα. Το φάσμα της δράσης των μακρολιδίων περιλαμβάνει ρύθμιση της λειτουργίας των λευκοκυττάρων και της παραγωγής φλεγμονωδών μεσολαβητών, έλεγχο της έκκρισης βλέννας, διάλυση της φλεγμονής και ρύθμιση των μηχανισμών άμυνας. Οι στόχοι των μακρολιδίων είναι πολλοί και συμμετέχουν σε πολλά σηματοδοτικά μονοπάτια (**Σχήμα 11**) [117]. Γι' αυτό το λόγο χρησιμοποιούνται σήμερα για τη θεραπεία χρόνιων φλεγμονωδών

ασθενειών, όπως κυστική ίνωση, χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια, διάχυτη πανβρογχιολίτιδα και άσθμα.



Σχήμα 11. Μοριακοί στόχοι των μακρολιδίων [117].

Ωστόσο, όπως φαίνεται και στο **Σχήμα 12**, απαιτείται ακόμα αρκετή έρευνα έτσι ώστε να επιτευχθεί μια πιο εμπειριστατωμένη άποψη για το πώς λειτουργεί το ανοσολογικό σύστημα *in vivo*, και να εξακριβωθούν οι ακριβείς στόχοι των μακρολιδίων και τα ρυθμιστικά τους στάδια στα μονοπάτια σηματοδότησης. Επειδή οι πρωτεΐνες και τα πεπτίδια είναι γενικά υδρόφιλα, δεν μπορούν να διαπεράσουν εύκολα τα υδρόφοβα φωσφολιπίδια που απαρτίζουν την κυτταρική μεμβράνη. Συνήθως, τα πεπτίδια και οι πρωτεΐνες δεσμεύονται στην ενεργή περιοχή υποδοχέων των G-πρωτεϊνών που βρίσκονται στην επιφάνεια του κυττάρου, μεταφέρουν το σήμα τους στον υποδοχέα, που με τη σειρά του το μεταβιβάζει στο κύτταρο και στη συνέχεια μετάγεται σε δεύτερους αγγελιοφόρους και τέλος σε έκφραση γονιδίου. Το που και το πώς τα μακρολίδια επηρεάζουν αυτό το δίκτυο εξωκυττάρων και ενδοκυττάρων επικοινωνιών είναι αντικείμενο συνεχούς έρευνας [144].



Σχήμα 12. Μακρολίδια και φλεγμονή. Προτεινόμενες ανοσορυθμιστικές δράσεις που επάγονται από τα μακρολίδια [144].

ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

1. ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΚΥΤΤΑΡΩΝ A549 & H441

Οι κυτταρικές σειρές A549 (ATCC CCL-185) και H441 (ATCC HTB-174) χρησιμοποιήθηκαν ως μοντέλα μελέτης των πνευμονοκυττάρων τύπου II.

Η κυτταρική σειρά A549 δημιουργήθηκε το 1972 από τον D.J. Giard et al. [145] από καλλιέργεια καρκινικών κυττάρων που απομονώθηκαν από πνεύμονα 58χρόνου Καυκάσιου άνδρα. Ο χρόνος διπλασιασμού των κυττάρων είναι περίπου 24 ώρες.

Η κυτταρική σειρά H441 (NCI-H441) δημιουργήθηκε το 1982 από τους Gazdar et al. [146] και προήλθε από κύτταρα που απομονώθηκαν από περικάρδιο υγρό ασθενούς με αδενοκαρκίνομα πνεύμονα. Η ηλεκτρονική μικροσκοπία έχει δείξει ότι τα κύτταρα διαθέτουν πολυστιβαδωτά σωμάτια και κυτοπλασμικές δομές που μοιάζουν με τους κοκκιώδεις σχηματισμούς που διαθέτουν τα κύτταρα Clara. Τα κύτταρα πολλαπλασιάζονται κάθε 48 ώρες σε πλήρες θρεπτικό υλικό.

Οι δύο κυτταρικές σειρές έχουν επίπεδο βιοασφάλειας (Biosafety Level) 1.

1.1 Καλλιέργειες

Συσκευές

1. Θάλαμος Επώασης. Η ανάπτυξη γίνεται σε επωαστήριο συστάσεως 5 % CO₂ -95 % αέρα, θερμοκρασίας 37 °C (Incubator, RS, Biotech, Galaxy, R)
2. Κλίβανος υγρής αποστείρωσης (autoclave)
3. Θάλαμος νηματοειδούς ροής (Laminar Flow, Hood Class II type A/B3, Nuair, Model No. 425-100, Ser. No. 27190AR)

Υλικά

1. Θρεπτικό υλικό Ham's F12K για την κυτταρική σειρά A549, Nutrient Mixture Kaighn's Modification 1X, 500 ml, Cat. No. 21127022, Gibco-BRL (Life Technologies, Inc., Inchinnan, Scotland)

2. Θρεπτικό υλικό RPMI-1640 για την κυτταρική σειρά H441 (500 ml, w/o glutamine, Cat. No. R-5886, Sigma)
3. Ανθρακικό νάτριο (7.5 % w/v Na_2CO_3 , Cat. No. 2080-060, Gibco-BRL)
4. Ορός εμβρύου βοός (Foetal Bovine Serum-FBS, Cat. No. A15-101, PAA, The Cell Culture Company)
5. Αποστειρωμένο φίλτρο 0.45 μm (Sterile Syringe Filter, Part. No. 431220, Corning, Germany)
6. Γλουταμίνη (200 mM L-Glutamine, Cat. No. K0282, Seromed, χωρίζεται σε αποστειρωμένα corning στο Hood, φυλάσσεται στους -20°C)
7. Αντιβιοτικό (Antibiotic-Antimycotic, prepared with: 10000 U/ml Penicillin G sodium, 10000 $\mu\text{g/ml}$ Streptomycin Sulfate, 25 $\mu\text{g/ml}$ amphotericin B as fungizone, Cat. No. 15240-062, Invitrogen Corporation, Gibco-BRL, χωρίζεται σε αποστειρωμένα corning στο Hood, φυλάσσεται στους -20°C)
8. Αιθανόλη (MB:46.07, assay 99.8 %, 1l=0.788 Kg, R:11, S:7-16, Riedel-de Haen)
9. Διμεθυλοσουλφοξείδιο αποστειρωμένο (DMSO, $\text{C}_2\text{H}_6\text{OS}$, 1X, 50 ml, Cat. No. 11101-011, Gibco)
10. Αποστειρωμένες πιπέτες μιας χρήσης των 5 και 10 ml, σωληνάκια Corning των 15, 45 ml, τρυβλία petri των 10 ml (100/20 mm sterile 15 pieces, Cellstar)
11. Ειδικές θήκες φύλαξης κυττάρων στο υγρό άζωτο των 5 θέσεων (Cryocane, aluminum, pcs. 12, Cat. No. 5015-0001, Nunc)

Διαλύματα εργασίας

1. Διάλυμα 12 N Αιθανόλης

350 ml απόλυτης αιθανόλης συμπληρώνονται μέχρι τελικού όγκου 500 ml με νερό. Φυλάσσεται σε θερμοκρασία δωματίου.

2. Αδρανοποίηση FBS

Το παρασκεύασμα του εμπορίου FBS απενεργοποιείται σε υδρόλουτρο στους 60°C για 30 min. Στη συνέχεια μοιράζεται σε αποστειρωμένα σωληνάκια/52 ml σε στείρες συνθήκες αφού πρώτα διηθηθεί σε αποστειρωμένο φίλτρο. Φυλάσσεται στους -20°C .

3. Πλήρες θρεπτικό υλικό καλλιέργειας κυττάρων A549 τελικής συγκεντρώσεως 10 % v/v σε FBS, 2 mM γλουταμίνη, 14.2 mM (1.5 g/l) Na_2CO_3 , 100 U/ml σε αντιβιοτικό

Στα 500 ml θρεπτικού υλικού F12K προστίθενται 50 ml αδρανοποιημένου FBS, 5 ml γλουταμίνης, 10 ml ανθρακικού νατρίου και 5 ml αντιβιοτικού σε στείρες συνθήκες. Το πλήρες θρεπτικό υλικό φυλάσσεται στους 4°C.

4. Πλήρες θρεπτικό υλικό καλλιέργειας κυττάρων H441 τελικής συγκεντρώσεως 10 % v/v σε FBS, 2 mM L-γλουταμίνη, 100 U/ml σε αντιβιοτικό

Σε 450 ml θρεπτικού υλικού RPMI προστίθενται 50 ml αδρανοποιημένου FBS, 5 ml γλουταμίνης και 5 ml αντιβιοτικού σε στείρες συνθήκες. Το θρεπτικό υλικό φυλάσσεται στους 4 °C.

Πάγωμα & Ξεπάγωμα των κυττάρων

Πάγωμα κυττάρων

Για τη δημιουργία αποθεμάτων (stock), σε 950 μl εναιωρήματος κυττάρων σε πλήρες θρεπτικό υλικό προστίθενται 50 μl αποστειρωμένου DMSO. Φυλάσσονται σε σωληνάρια υψηλής κατάψυξης (cryovials) στους -80 °C για 2-5 μέρες (ρυθμός παγώματος 1 °C/min περίπου) και στη συνέχεια τοποθετούνται σε υγρό άζωτο.

Ξεπάγωμα κυττάρων

Για την εκκίνηση νέας καλλιέργειας το σωληνάριο με το απόθεμα τοποθετείται σε υδρόλουτρο 37 °C για 1-2 min. Με αυτόματη πιπέττα τα κύτταρα αναδιασπείρονται προσεκτικά στο θάλαμο νηματώδους ροής όπου και ετοιμάζεται η καλλιέργεια σε τρυβλία των 10 ml με το αντίστοιχο θρεπτικό υλικό. Ενδεικτικά, παρατηρήθηκε ότι απόθεμα κυττάρων που ήταν παγωμένο για 6 μήνες στο υγρό άζωτο και χρησιμοποιήθηκε για καλλιέργεια εργασίας είχε διατηρήσει τη βιωσιμότητά του σε ικανοποιητικό ποσοστό (80 %).

1.2 Καμπύλη ανάπτυξης

Προκειμένου να ετοιμαστούν καλλιέργειες κυττάρων σε τρυβλία ελαστικής μεμβράνης κατασκευάστηκαν καμπύλες ανάπτυξης. Τα χρονικά διαστήματα παρακολούθησης των καλλιεργειών επιλέχθηκαν με βάση το χρόνο διπλασιασμού της κάθε κυτταρικής σειράς. Η καλλιέργεια των κυττάρων ($4.1 \times 10^4/\text{cm}^2$ για τα A549 και $3.1 \times 10^4/\text{cm}^2$ για τα H441) ετοιμάστηκε σε τρυβλία με ελαστική μεμβράνη και σε τρυβλία χωρίς ελαστική μεμβράνη. Η μέτρηση του αριθμού των κυττάρων έγινε μετά από χρώση με Trypan Blue αραιωμένη 1:10 με νερό.

Συσκευές - Υλικά

1. Ανάστροφο Ηλεκτρονικό Μικροσκόπιο (Ser.No.1131010065, Cat. No. D-22976, Kruss, Hamburg, Germany)
2. Βαφή Trypan Blue (Blue solution 0.4 % in NaCl, Cat. No. T- 8154, Sigma)
3. Πιπέττες αριθμημένες και πιπέττες Pasteur, αιματοκυτόμετρο, καλυπτρίδες
4. Τρυβλία ελαστικής μεμβράνης διαμέτρου 5.0 cm (Petriperm Hydrophilic, Cat. No. D-37079, Vivascience, Rudolf-Wissell-Str.28).
5. Τρυβλία petri των 5 ml (60/15 mm sterile, Cellstar)

1.2.1 Μικροσκοπική παρατήρηση - Μέτρηση αριθμού κυττάρων

Υπό στείρες συνθήκες μεταφέρεται μικρή ποσότητα εναιωρήματος κυττάρων (40 μl) σε πλαστικό σωληνάκι. Ακολούθως, γίνεται αραίωση 1:1 με το διάλυμα βαφής Trypan Blue, τοποθετήθηκαν 10 μl στο αιμοκυτόμετρο και η μέτρηση έγινε σε ανάστροφο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σε φακό x40. Τα ζωντανά κύτταρα έχουν μικρό σφαιρικό σχήμα και «λαμπυρίζουν» ενώ τα νεκρά έχουν μπλε χρώμα.

1.2.2 Επεξεργασία των αποτελεσμάτων

Ο υπολογισμός του αριθμού των κυττάρων/ ml έγινε σύμφωνα με τον τύπο:

$$\text{Συνολικός αριθμός κυττάρων / ml} = A \times \lambda \times 10^4$$

Όπου: A = μέσος όρος των κυττάρων που μετρήθηκαν

λ = αραίωση του δείγματος με τη βαφή

10^4 = συντελεστής διόρθωσης του όγκου του υγρού που συγκρατείται στο αιμοκυτόμετρο.

Ακολούθως κατασκευάζεται καμπύλη ανάπτυξης η οποία απεικονίζει τον αριθμό κυττάρων/cm² συναρτήσει του χρόνου ανάπτυξης των κυττάρων.

1.3 Καλλιέργειες A549 και H441 εργασίας (working)

Υλικά

1. Θρεπτικό υλικό Ham's F12K για την κυτταρική σειρά A549, Nutrient Mixture Kaighn's Modification 1X, 500 ml, Cat. No. 21127022, Gibco-BRL (Life Technologies, Inc., Inchinnan, Scotland)

2. Θρεπτικό υλικό RPMI-1640 για την κυτταρική σειρά H441 (500 ml, w/o glutamine, Cat. No. R-5886, Sigma)
3. Ανθρακικό νάτριο (7.5 % w/v Na_2CO_3 , Cat. No. 2080-060, Gibco-BRL)
4. Ορός εμβρύου βοός (Foetal Bovine Serum-FBS, Cat. No. A15-101, PAA, The Cell Culture Company)
5. Αποστειρωμένο φίλτρο 0.45 μm (Sterile Syringe Filter, Part. No. 431220, Corning, Germany)
6. Γλουταμίνη (200 mM L-Glutamine, Cat. No. K0282, Seromed, χωρίζεται σε αποστειρωμένα corning στο Hood, φυλάσσεται στους -20°C)
7. Αντιβιοτικό (Antibiotic-Antimycotic, prepared with: 10000 U/ml Penicillin G sodium, 10000 $\mu\text{g/ml}$ Streptomycin Sulfate, 25 $\mu\text{g/ml}$ amphotericin B as fungizone, Cat. No. 15240-062, Invitrogen Corporation, Gibco-BRL, χωρίζεται σε αποστειρωμένα corning στο Hood, φυλάσσεται στους -20°C)
8. Αποστειρωμένες πιπέττες μιας χρήσης των 5 και 10 ml, σωληνάκια Corning των 15, 45 ml, τρυβλία petri των 10 ml (100/20 mm sterile 15 pieces, Cellstar)

Διαλύματα

1. Πλήρες θρεπτικό υλικό καλλιέργειας κυτάρων A549 τελικής συγκεντρώσεως 10 % v/v σε FBS, 2 mM γλουταμίνη, 14.2 mM (1.5 g/l) Na_2CO_3 , 100 U/ml σε αντιβιοτικό

Στα 500 ml θρεπτικού υλικού F12K προστίθενται 50 ml αδρανοποιημένου FBS, 5 ml γλουταμίνης, 10 ml ανθρακικού νατρίου και 5 ml αντιβιοτικού σε στείρες συνθήκες. Το πλήρες θρεπτικό υλικό φυλάσσεται στους 4°C .

2. Πλήρες θρεπτικό υλικό καλλιέργειας κυτάρων H441 τελικής συγκεντρώσεως 10 % v/v σε FBS, 2 mM L-γλουταμίνη, 100 U/ml σε αντιβιοτικό

Σε 450 ml θρεπτικού υλικού RPMI προστίθενται 50 ml αδρανοποιημένου FBS, 5 ml γλουταμίνης και 5 ml αντιβιοτικού σε στείρες συνθήκες. Το θρεπτικό υλικό φυλάσσεται στους 4°C .

Πειραματική εκτέλεση

Ο απαιτούμενος όγκος κυτάρων προστίθεται σε τρυβλία έτσι ώστε κάθε θέση να περιέχει 8×10^5 κύτταρα. Ο όγκος συμπληρώνεται στα 5 ml με πλήρες θρεπτικό υλικό. Τα τρυβλία τοποθετούνται στον επωαστήρα για 24h προκειμένου να προσκολληθούν.

2. ΛΗΨΗ ΚΑΙ ΚΑΤΕΡΓΑΣΙΑ ΒΡΟΓΧΟΚΥΨΕΛΙΔΙΚΟΥ ΕΚΠΛΥΜΑΤΟΣ (BAL)

Η διαδικασία αφορά στην έγχυση αποστειρωμένου φυσιολογικού ορού, διαμέσου βρογχοσκοπίου, στους πνεύμονες. Στη συνέχεια το υγρό ανακτάται με εισρόφηση και παρέχει χρήσιμες πληροφορίες για την ανοσολογική κατάσταση του πνευμονικού παρεγχύματος του κάθε ασθενή.

Υλικά- Συσκευές

1. Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων (PBS, Phosphate Balanced Salt Solution, Gibco)
2. Θρεπτικό υλικό RPMI χωρίς φαινόλη (RPMI-1640, Biochrom)
3. Ορός βοός (FBS, Fetal bovine serum, PAA laboratories GmbH)
4. Γλουταμίνη 200 mM (L-glutamine 200 mM, Seromed)
5. Gentamicin (Schering-Plough, 80 mg/φιαλίδιο)
6. Fungostatin (100 mg/50 ml, Pfizer)
7. Αποστειρωμένα φιλτράκια (cell strainer, 70µm nylon, Falcon,, 352350)
8. Ψυχόμενη φυγόκεντρος Juan (Ser. No. 30201076, Cat. No.11175703, Juan CR3i)

Διαλύματα

1. Πλήρες θρεπτικό υλικό:

Σε αποστειρωμένο corning των 50 ml προστίθενται:

- 26.7 ml απλού θρεπτικού υλικού
- 3 ml ορού βοός ο οποίος έχει θερμανθεί για 30 λεπτά στους 60°C για την απενεργοποίηση συμπληρώματος
- 0.3 ml γλουταμίνης
- 60 µl gentamicin
- 30 µl fungostatin

Το διάλυμα διατηρείται στους 4°C.

Πειραματική εκτέλεση

Αποστειρωμένος φυσιολογικός ορός σε θερμοκρασία 37 °C εγχύθηκε διαμέσου βρογχοσκοπίου με οπτικές ίνες. Το πρώτο κλάσμα υγρού που ανακτάται απορρίπτεται, ενώ το υπόλοιπο υγρό (BAL) συλλέγεται σε σωλήνες. Η όλη διεργασία του BAL πραγματοποιείται σε θερμοκρασία 4°C για την αποφυγή αποδόμησης του

PAF από την ενεργότητα PAF-ακετυλυδρολάσης. Στη συνέχεια το BAL διηθείται από αποστειρωμένα φίλτρα (cell strainer, 70µm nylon, Falcon, 352350) για την απομάκρυνση της βλέννας και φυγοκεντρείται στα 500 g, για 15 λεπτά, στους 4°C, σε ψυχόμενη φυγόκεντρο (Juan, CR3i) για την απομόνωση των κυττάρων. Μετά τη φυγοκέντρηση το απαλλαγμένο από κύτταρα υπερκείμενο BAL συλλέγεται και φυλάσσεται για περαιτέρω αναλύσεις. Το ίζημα των κυττάρων εναιωρείται σε 3 ml ρυθμιστικού διαλύματος PBS και φυγοκεντρείται στα 500 g, για 10 λεπτά σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Το στάδιο της έκπλυσης επαναλαμβάνεται ακόμα μια φορά και τελικά τα κύτταρα εναιωρούνται σε 1 ml πλήρους θρεπτικού υλικού. Ακολουθεί μέτρηση κυτταρικών πληθυσμών και βιωσιμότητας όπως περιγράφηκε προηγουμένως.

2.1 Επίστρωση των κυττάρων σε τρυβλία

Υλικά

1. Θρεπτικό υλικό (RPMI-1640, Biochrom)
2. Ορός βοός (FBS, Fetal Bovine Serum, PAA laboratories GmbH)
3. Γλουταμίνη 200 mM (L-glutamine 200 mM, Seromed)
4. Gentamicin (Schering-Plough, 80 mg/φιαλίδιο)
5. Fungostatin (Pfizer, 100 mg/50 ml)
6. $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Merck)
7. $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (Merck)
8. Βακτηριοστατικά φίλτρα (Becton –Dickinson)

Διαλύματα εργασίας

1. Πλήρες θρεπτικό υλικό (όπως αναφέρθηκε προηγουμένως)

2. Θρεπτικό υλικό απουσία FBS:

Σε αποστειρωμένο corning των 50ml:

- 29.7 ml απλού θρεπτικού υλικού
- 0.3 ml γλουταμίνης
- 60µl gentamicin
- 30µl fungostatin

Το διάλυμα διατηρείται στους 4°C.

3. Διάλυμα ιόντων ασβεστίου/ μαγνησίου

0.2 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ και 0.6 g $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ διαλύονται σε 10 ml αποστειρωμένου νερού. Το διάλυμα διηθείται από βακτηριοστατικό φίλτρο και φυλάσσεται στους 4°C.

Πειραματική εκτέλεση

Ο απαιτούμενος όγκος κυττάρων προστίθεται σε τρυβλία 4-θέσεων έτσι ώστε κάθε θέση να περιέχει 1×10^6 κύτταρα. Ο όγκος συμπληρώνεται στο 1 ml με πλήρες θρεπτικό υλικό και 40 μl διαλύματος ιόντων ασβεστίου / μαγνησίου. Τα κύτταρα επωάζονται για 3 ώρες σε επωαστικό θάλαμο (Nuair, 37 °C, 5 % CO_2) για την επικόλλησή τους στα τρυβλία.

3. ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΜΗΧΑΝΙΚΗΣ ΔΙΑΤΑΣΗΣ**Αρχή της μεθόδου**

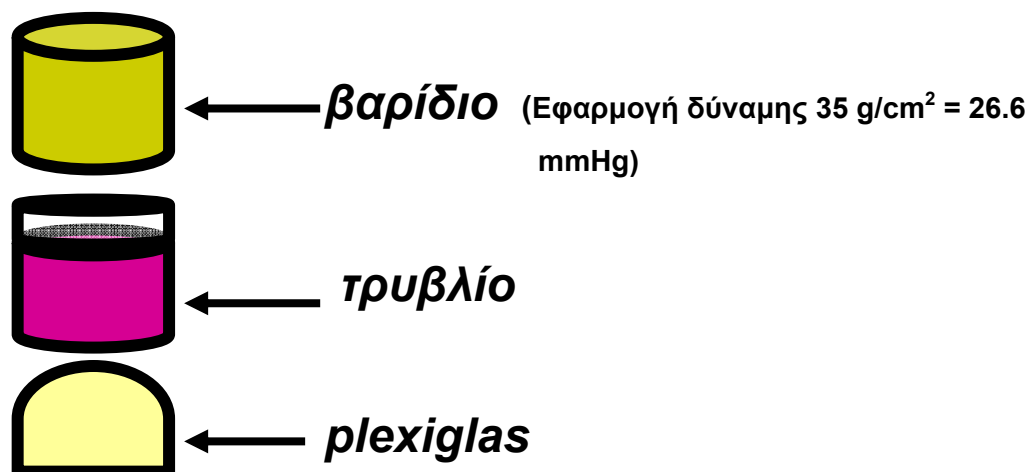
Η μηχανική διάταση (mechanical stretch) αποτέλεσε το μηχανικό ερέθισμα για τη μελέτη της επαγωγής της φλεγμονής στις κυτταρικές σειρές A549 και H441, καθώς και στα μακροφάγα κύτταρα του BAL.

Υλικά

1. Τρυβλία ελαστικής μεμβράνης διαμέτρου 5.0 cm (Petri perm Hydrophilic, Cat. No. D-37079, Vivascience, Rudolf-Wissell-Str.28)
2. Plexiglas, κυλινδρικά ορειχάλκινα βαρίδια 712 g, διαμέτρου 5.0 cm

3.1 Συσκευή μηχανικής διάτασης

Καλλιέργειες κυττάρων A549, H441 και BAL ετοιμάστηκαν σε τρυβλία με ελαστική μεμβράνη όπως περιγράφηκε προηγουμένως. Όταν τα κύτταρα σχηματίσουν ταπήτιο (confluent 90 %, 24 ώρες για τα A549 και τα H441 και 4 ώρες για τα κύτταρα του BAL) σε πλήρες θρεπτικό υλικό, το πλήρες θρεπτικό υλικό αντικαθίσταται με θρεπτικό υλικό χωρίς ορρό και το σύστημα αφήνεται για εξισορρόπηση για 30 min. Τα τρυβλία τοποθετούνται πάνω σε Plexiglas και τοποθετούνται βαρίδια για 30 min 1, 4 και 24 ώρες. Η εφαρμογή της πίεσης γίνεται σε επωαστικό θάλαμο σε θερμοκρασία 37 °C, συστάσεως 95 % σε οξυγόνο και 5 % σε CO_2 . Η δύναμη 35 g /cm² που εφαρμόζεται αντιστοιχεί σε πίεση 26.6 mmHg ή αλλιώς 36.2 cm H_2O **Σχήμα 13.**



Σχήμα 13. Επίδραση μηχανικής διάτασης.

4. ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΑΖΙΘΡΟΜΥΚΙΝΗΣ ΚΑΙ LPS

Εισαγωγή

Τα αντιβιοτικά (μακρολίδια) αποτελούν μια τάξη αντιμικροβιακών με αντιμικροβιακή δράση τόσο κατά των θετικά κατά gram βακτηρίων όσο και κατά των αρνητικά κατά gram βακτηρίων. Πέραν όμως της παραδοσιακής αντιμικροβιακής τους δράσης, σημειώνεται και αντιφλεγμονώδης δράση σε ασθενείς με άσθμα, κυστική ίνωση και βρογχίτιδα. Η αζιθρομυκίνη ανήκει στην τάξη των μακρολιδίων και σχηματίζει έναν αμφίδρομο δεσμό με την 50S υπομονάδα του ριβοσώματος των βακτηρίων, παρεμποδίζοντας την πρωτεϊνική σύνθεση.

Ο βακτηριακός λιποπολυσακχαρίτης (LPS) είναι ένα λιπίδιο το οποίο βρίσκεται σε αφθονία στο εξωτερικό περίβλημα των Gram αρνητικών βακτηρίων. Έχει μεγάλη ενδοτοξική ικανότητα μιας και μπορεί να επιφέρει την παραγωγή πληθώρας φλεγμονωδών μεσολαβητών.

Υλικά

1. Zithromax IV (Pfizer)
2. Λιποπολυσακχαρίτης (LPS, lipopolysaccharide, Sigma)

Διαλύματα εργασίας

1. Διάλυμα εργασίας λιποπολυσακχαρίτη

2 mg λιποπολυσακχαρίτη διαλύονται σε 2.5 ml νερού. Το διάλυμα διαμοιράζεται σε errendorfs και φυλάσσεται στους 4°C. Σε κάθε τρυβλίο προστίθενται 6,3 μl για τελική συγκέντρωση 1μg/ml.

2. Διάλυμα εργασίας αζιθρομυκίνης

Κάθε φιαλίδιο περιέχει 500 mg αζιθρομυκίνη. Το περιεχόμενο του φιαλιδίου διαλύεται σε 5 ml φυσιολογικό ορό. Το διάλυμα που προκύπτει από την ανασύσταση περιέχει 100 mg/ml αζιθρομυκίνης. Στο τελευταίο γίνεται αραίωση 1:10 και από αυτό χρησιμοποιούνται 2.5 μl για τελική συγκέντρωση 5μg/ml και 10 μl για τελική συγκέντρωση 20 μg/ml.

Πειραματική εκτέλεση

Καλλιέργειες κυττάρων A549 και BAL ετοιμάστηκαν σε τρυβλία με πλαστικό πάτο όπως περιγράφηκε πριν. Όταν τα κύτταρα είχαν σχηματίσει ταπήτιο (confluent 90 %, 24 ώρες για τα A549 και 4 ώρες για τα κύτταρα του BAL) σε πλήρες θρεπτικό υλικό, το πλήρες θρεπτικό υλικό αντικαταστάθηκε με θρεπτικό υλικό χωρίς ορμό και το σύστημα αφέθηκε για εξισορρόπηση για 30 min. Στη συνέχεια έγινε προεπώαση των κυττάρων για 1 h με 1μg/ml LPS και ακολούθως επίδραση με αζιθρομυκίνη σε συγκεντρώσεις 5μg/ml και 20μg/ml. Παράλληλα ετοιμάστηκαν και καλλιέργειες στις οποίες δεν έγινε καμία επίδραση (καλλιέργειες control).

5. ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΑΝΑΣΤΟΛΕΩΝ: ΚΥΚΛΟΕΞΙΜΙΔΙΟ ΚΑΙ ΑΚΤΙΝΟΜΥΚΙΝΗ

Το κυκλοεξιμίδιο χρησιμοποιήθηκε ως αναστολέας της πρωτεϊνικής σύνθεσης ενώ η ακτινομυκίνη ως αναστολέας της μεταγραφής.

Υλικά

1. Cycloheximide (Sigma)
2. Actinomycin D (Sigma, A1410)

Πειραματική εκτέλεση

Καλλιέργειες κυττάρων A549 ετοιμάστηκαν σε τρυβλία με πλαστικό πάτο όπως περιγράφηκε πριν. Όταν τα κύτταρα είχαν σχηματίσει ταπήτιο (confluent 90 %, 24 ώρες για τα A549) σε πλήρες θρεπτικό υλικό, το πλήρες θρεπτικό υλικό αντικαταστάθηκε με θρεπτικό υλικό χωρίς ορρό και το σύστημα αφέθηκε για εξισορρόπηση για 30 min. Στη συνέχεια έγινε προεπώαση των κυττάρων για 1 h με κυκλοεξιμίδιο (1μM). Μετά το πέρας της 1 h προστέθηκε 1μg/ml LPS και ακολούθως επίδραση με αζιθρομυκίνη σε συγκεντρώσεις 5μg/ml και 20μg/ml. Η ίδια διαδικασία ακολουθήθηκε και για την ακτινομυκίνη D (100 nM). Παράλληλα ετοιμάστηκαν και καλλιέργειες στις οποίες δεν έγινε καμία επίδραση (καλλιέργειες control).

6. ΠΑΡΑΛΑΒΗ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

Αρχή της μεθόδου

Η παραλαβή των κυττάρων από το θρεπτικό υλικό έγινε με διαδοχικές φυγοκεντρήσεις και εναιώρησή τους σε κατάλληλο ισότονο διάλυμα.

Υλικά –Συσκευές

1. Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (PBS 1X, 500 ml, Cat. No. 10010-015 Gibco)
2. Θρυψίνη (Trypsin-EDTA 1x, 0.5 g/l trypsin, 0.2 g/l EDTA in PBS 1x, Cat. No. L11-004, PAA Laboratories, GMBH, Haidmannweg, A-4061, Pasching, Australia, 100 ml, φυλάσσεται στους -20 °C)
3. Αιθανόλη (MB:46.07, assay 99.8 %, 1l=0.788 Kg, R:11, S:7-16, Riedel-de Haen)
4. Αποστειρωμένες πιπέττες μιας χρήσης των 5 και 10 ml, σωληνάκια Corning των 15, 45 ml
5. Ψυχόμενη φυγόκεντρος Juan (Ser. No. 30201076, Cat. No.11175703, Juan CR3i)

Πειραματική εκτέλεση (εργασία σε τρυβλία διαμέτρου 5 cm)

Σε στείρες συνθήκες παραλαμβάνεται το υπερκείμενο του κάθε τρυβλίου ξεχωριστά, φυγοκεντρείται στα 500g, για 5 λεπτά, παραλαμβάνεται το υπερκείμενο απαλλαγμένο κυττάρων και φυλάσσεται στους -80 °C για περαιτέρω αναλύσεις. Το ταπήτιο των κυττάρων εκπλένεται 2 φορές με 1.5 ml PBS και ακολουθεί αποκόλληση των κυττάρων με 1 ml διαλύματος Trypsin-EDTA. Τα τρυβλία τοποθετούνται στον επωαστήρα για 5 min. Ακολουθεί αδρανοποίηση θρυψίνης με 2 ml πλήρες θρεπτικό υλικό και τα κύτταρα φυγοκεντρούνται σε 500xg για 10 min στους 4 °C. Το υπερκείμενο απορρίπτεται και το ίζημα των κυττάρων εναιωρείται σε 1 ml PBS. Ακολουθεί φυγοκέντρηση όπως προηγούμενα. Το ίζημα των κυττάρων εναιωρείται σε 1 ml PBS. Στη συνέχεια, γίνεται μέτρηση του αριθμού των κυττάρων και ομογενοποίηση με υπέρηχους (4x15 sec, 25 W) στους 4 °C.

7. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ ΚΑΤΑ BRADFORD (μικρομέθοδος για 0 έως 20 μg πρωτεΐνης)

Αρχή της μεθόδου

Η μέθοδος προσδιορισμού της πρωτεΐνης κατά Bradford περιλαμβάνει την προσθήκη μιας όξινης χρωστικής Coomassie Brilliant Blue G-250 σε διάλυμα πρωτεΐνης. Αυτή η χρωστική συνδέεται με τα βασικά και αρωματικά αμινοξέα καταλήγοντας σε μια μεταβολή της απορρόφησης από τα 465 nm σε 595 nm.

Πιο λεπτομερείς μελέτες δείχνουν ότι η ελεύθερη βαφή μπορεί να υπάρχει σε 4 διαφορετικές μορφές ιοντισμού για τις οποίες οι τιμές της pK_a είναι 1.15, 1.82 και 12.4. Το μεγαλύτερο ποσοστό από τις κατιοντικές κόκκινες και πράσινες τιμές της βαφής, οι οποίες επικρατούν στο διάλυμα αντίδρασης της όξινης χημικής δοκιμής, έχουν μέγιστη απορρόφηση στα 470 και 650 nm, αντίστοιχα. Σε αντίθεση, το μεγαλύτερο ποσοστό της ανιοντικής μπλε μορφής της βαφής, η οποία δεσμεύεται στην πρωτεΐνη, έχει μια μέγιστη απορρόφηση στα 590 nm. Έτσι, η ποσότητα της πρωτεΐνης μπορεί να υπολογιστεί με τον προσδιορισμό της ποσότητας της βαφής σε μπλε ιοντική μορφή. Αυτό επιτυγχάνεται μετρώντας την απορρόφηση του διαλύματος στα 595 nm.

Η μικρομέθοδος είναι η πιο ευαίσθητη μέθοδος προσδιορισμού πρωτεΐνης και χρησιμοποιείται όταν η ποσότητα της άγνωστης πρωτεΐνης είναι μικρή. Η μικρομέθοδος Bradford χρησιμοποιείται για αραιά διαλύματα πρωτεΐνης 1-20 μg [147].

Υλικά - Συσκευές

1. Dye Reagent της Bio-Rad Protein Assay
2. Αλβουμίνη ορού βοός (BSA, Bovine Serum Albumin, Fraction V, 5gr, assay 96%, A2153, Sigma)
3. Πλαστική κυψελίδα 1ml
4. Πλαστικοί σωλήνες πολυπροπυλενίου erpedorf του 1ml
5. Φωτόμετρο SHIMADZU UV-1601

Διαλύματα εργασίας

1. Πρότυπο διάλυμα (Protein Standard) 0.1 μg/μl BSA σε δις-απεσταγμένο νερό

Ζυγίζονται 50 mg Αλβουμίνης και διαλύονται σε 50 ml δις-απεσταγμένο νερό. Το διάλυμα αφήνεται προς ήπια μαγνητική ανάδευση για λίγες ώρες στους 37°C μέχρι να διαλυθεί πλήρως η BSA. Κατόπιν αραιώνονται 500 μl από το διάλυμα προσθέτοντας 4500 μl δις-απεσταγμένου νερού και ακολουθεί ανάδευση. Το έτοιμο προς χρήση τελικό διάλυμα φυλάσσεται σε πλαστικό δοχείο (Corning) στους -20°C.

Πειραματική εκτέλεση

Πρότυπη καμπύλη

Προστίθενται 0, 10, 20, 30, 40, 50 και 60 μl προτύπου διαλύματος BSA 0.1 μg/μl σε erpordf. Η συμπλήρωση σε όγκο 0.8 ml γίνεται με απεσταγμένο νερό και ο όγκος συμπληρώνεται στο 1ml με 0.2 ml βαφής.

Πρωτεϊνικά δείγματα

Τα δείγματα τοποθετούνται σε erpordf και συμπληρώνεται ο όγκος μέχρι τα 0.8 ml με απεσταγμένο νερό. Ακολουθεί προσθήκη 0.2 ml βαφής, ήπια ανάδευση, επώαση για 5 min και φωτομέτρηση στα 595 nm (**Πίνακας 2**).

Πίνακας 2. Πειραματική πορεία για την παρασκευή της πρότυπης καμπύλης και την κατεργασία προτύπων και δειγμάτων για τον προσδιορισμό συγκέντρωσης πρωτεΐνης με τη μέθοδο Bradford.

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ	T	1	2	3	4	5	6	ΔΕΙΓΜΑ
BSA 0.1 mg/ml (μl)	0	10	20	30	40	50	60	-
d H₂O (μl)	800	790	780	770	760	750	740	-
Dye Reagent (μl)	200	200	200	200	200	200	200	-
Ανάδευση								
Παραμονή 5 min								
Φωτομέτρηση 595 nm								
BSA μg	0	1	2	3	4	5	6	

Επεξεργασία αποτελεσμάτων

Από τις απορροφήσεις των προτύπων και με βάση τη γνωστή τους συγκέντρωση σε αλβουμίνη, χρησιμοποιώντας το λογισμικό Excel, κατασκευάζεται σε γράφημα η βέλτιστη ευθεία της μορφής $y=ax$ (απορρόφηση συναρτήσει μg πρωτεΐνης) σύμφωνα με τη γραμμική σχέση του νόμου του Beer. Με βάση την καμπύλη υπολογίζεται η άγνωστη συγκέντρωση των δειγμάτων σε πρωτεΐνη. Γίνεται αναγωγή της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών ανά ml δείγματος.

8. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ ΚΑΤΑ LOWRY

Αρχή της μεθόδου

Αρχικά οι πρωτεΐνες δεσμεύονται με ιόντα Cu^{2+} σε αλκαλικό περιβάλλον. Η μέθοδος Lowry [148] βασίζεται στην αναγωγή του αντιδραστήριου Folin & Ciocalteu (φωσφο-μολυβδαινικό-φωσφο-βολφραμικό οξύ). Το αντιδραστήριο αυτό, ανάγεται από τα σύμπλοκα πρωτεϊνών- Cu^{2+} με αποτέλεσμα την ανάπτυξη κυανού χρώματος που απορροφά στα 750nm.

Υλικά

1. NaOH (Scharlau)
2. Na_2CO_3 (Sigma)
3. $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (Sigma)
4. Κιτρικό νάτριο (Sigma)
5. Αντιδραστήριο φαινόλης (Folin & Ciocalteu's phenol reagent, Sigma)
6. Αλβουμίνη ορού βοός (BSA, bovine serum albumin, Sigma-aldrich)

Διαλύματα

1. Διάλυμα 1 N NaOH

4 g NaOH διαλύονται σε νερό μέχρι τελικού όγκου 100 ml. Ακολουθεί ήπια ανάδευση. Το διάλυμα φυλάσσεται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.

2. Διάλυμα 0.5 N NaOH

2 g NaOH διαλύονται σε νερό μέχρι τελικού όγκου 100 ml. Ακολουθεί ήπια ανάδευση. Το διάλυμα φυλάσσεται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.

3. Διάλυμα 2 % Na_2CO_3

2 g Na_2CO_3 διαλύονται σε 1 lt νερού. Ακολουθεί ήπια ανάδευση. Το διάλυμα φυλάσσεται στους 4°C.

4. Διάλυμα 1 % κιτρικού νατρίου

1.139 g κιτρικού νατρίου διαλύονται σε 100 ml νερού. Ακολουθεί ήπια ανάδευση. Το διάλυμα φυλάσσεται στους 4°C.

5. Διάλυμα 0.5 % CuSO₄ σε 1 % κιτρικό νάτριο

0.5 g CuSO₄ διαλύονται σε 100 ml διαλύματος 1 % κιτρικού νατρίου. Ακολουθεί ήπια ανάδευση. Το διάλυμα φυλάσσεται στους 4°C.

6. Μίγμα διαλυμάτων 2 % Na₂CO₃ και 0.5 % CuSO₄ (50 : 1)

Σε 50 ml διαλύματος 2 % Na₂CO₃ προστίθεται 1 ml διαλύματος 0.5 % CuSO₄. Ακολουθεί ήπια ανάδευση. Το διάλυμα ετοιμάζεται λίγο πριν την χρήση του.

7. Πρότυπο διάλυμα BSA σε 0.5 N NaOH (200 µg/ml)

20 mg BSA διαλύονται σε 100 ml 0.5 N NaOH. Ακολουθεί ανάδευση υπό ήπια θέρμανση έως ότου διαλυθεί η BSA. Το διάλυμα φυλάσσεται στους -20°C.

8. Διάλυμα εργασίας φαινόλης

Ο απαιτούμενος όγκος αντιδραστήριου Folin & Ciocalteu's phenol reagent αναμιγνύεται με ίσο όγκο νερού. Το αντιδραστήριο παρασκευάζεται λίγο πριν την χρήση του.

Πειραματική εκτέλεση

Προετοιμασία δειγμάτων

Κατάλληλος όγκος δείγματος μεταφέρεται σε πλαστικό σωλήνα. Ο μέγιστος όγκος που μπορεί να χρησιμοποιηθεί είναι 500 µl. Ακολούθως προστίθεται ίσος όγκος διαλύματος 1 N NaOH και ο όγκος συμπληρώνεται στο 1 ml με την προσθήκη διαλύματος 0.5 N NaOH. Το μίγμα αναδεύεται και είτε επωάζεται για 2 ώρες σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για άμεση ανάλυση, είτε φυλάσσεται στους 4°C για επακόλουθη.

Παρασκευή πρότυπης καμπύλης

Σε 6 πλαστικούς σωλήνες προστίθενται 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 και 1 ml πρότυπου διαλύματος BSA 200 µg/ml αντίστοιχα (εύρος συγκεντρώσεων 0-200 µg/ml). Ο όγκος συμπληρώνεται στο 1 ml με 0.5 N NaOH.

Κατεργασία δειγμάτων και προτύπων

Σε κάθε σωλήνα, δείγματος και προτύπων, προστίθενται από 5 ml διαλύματος 2 % Na₂CO₃-0.5 % CuSO₄. ακολουθεί ανάδευση και επώαση για 10 λεπτά. Στη συνέχεια προστίθεται 0.5 ml διαλύματος εργασίας φαινόλης, με άμεση ανάδευση κατά την προσθήκη και επώαση για 30 λεπτά. Η φωτομέτρηση των δειγμάτων και των

προτύπων γίνεται σε γυάλινη κυψελίδα στα 750 nm. Η πειραματική πορεία φαίνεται σχηματικά στον **Πίνακα 3**.

Πίνακας 3. Πειραματική πορεία για την παρασκευή της πρότυπης καμπύλης και την κατεργασία προτύπων και δειγμάτων για τον προσδιορισμό συγκέντρωσης πρωτεΐνης με τη μέθοδο Lowry.

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ	T	1	2	3	4	5	ΔΕΙΓΜΑ
<i>BSA (ml)</i>	-	0.2	0.4	0.6	0.8	1	-
<i>BSA (μg)</i>	0	40	80	120	160	200	-
<i>0.5 N NaOH (ml)</i>	1	0.8	0.6	0.4	0.2	0	-
<i>Na₂CO₃+CuSO₄ (50:1) (ml)</i>	5	5	5	5	5	5	5
ΕΠΩΑΣΗ 10 ΛΕΠΤΑ							
<i>FOLIN+H₂O (1:1) (ml)</i>	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
ΕΠΩΑΣΗ 30 ΛΕΠΤΑ							
ΦΩΤΟΜΕΤΡΗΣΗ ΣΤΑ 750 nm							

Επεξεργασία αποτελεσμάτων

Από τις απορροφήσεις των προτύπων και τις γνωστές συγκεντρώσεις αυτών (0, 40, 80, 120, 160, 200 μg BSA/ml) κατασκευάζεται σε γράφημα η βέλτιστη ευθεία που έχει την μορφή $y=ax+b$. Από την εξίσωση αυτή η οποία παρέχει την απορρόφηση συναρτήσει μg πρωτεΐνης, υπολογίζεται η άγνωστη συγκέντρωση των πρωτεϊνών του δείγματος.

9. ΦΘΟΡΙΣΜΟΜΕΤΡΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ PLA₂

Αρχή της μεθόδου

Για τον προσδιορισμό της ενεργότητας PLA₂ με τη φθορισμομετρική μέθοδο χρησιμοποιείται ως υπόστρωμα φωσφατιδυλοχολίνη, η οποία στη θέση sn-2 του μορίου της είναι εστεροποιημένη με μεγάλης αλυσίδας λιπαρό οξύ το οποίο στην άκρη έχει φθορίζουσα ομάδα (C12-NBD-PC). Η φθορίζουσα C12-NBD-φωσφατιδυλοχολίνη όταν βρίσκεται σε υδατικό διάλυμα και διεγερθεί στα 475 nm φθορίζει ελάχιστα στα 535 nm. Υδρόλυση αυτής από μια φωσφολιπάση A2 έχει ως αποτέλεσμα την απελευθέρωση του C12-NBD-λιπαρού οξέος το οποίο σε υδατικό διάλυμα φθορίζει 50 φορές περισσότερο από το υπόστρωμα χωρίς καμία μετατόπιση του μεγίστου μήκους κύματος εκπομπής [149]. Το ρυθμιστικό διάλυμα που χρησιμοποιείται περιέχει ιόντα ασβεστίου.

Υλικά- Όργανα

1. Φθορισμόμετρο (Luminescence Spectrometer LS55, Part No. L2250107, Serial No. 68002, Perkin Elmer)
2. C₁₂-NBD-PC (1-palmitoyl-2-[6-[(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)amino] dodecanoyl]-sn-glycero-3-phosphocholine, Cat.No. 810131, Avanti Polar Lipids, Pelham, AL, USA)
3. C₁₂-NBD-FA (12-(N-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)amino] dodecanoic acid, Cat. No. N678, Molecular Probes Europe BV, Netherlands)
4. Αιθανόλη (MW:46.07, assay 99.8 %, 1l=0.788 Kg, R:11, S:7-16, Riedel-de Haen)
5. Tris-HCl (C₄H₁₁NO₃.HCl, FW:157.6, R:36/37/38, S:26-36, T-3253, Sigma)
6. Χλωριούχο ασβέστιο (CaCl₂, FW:110.98, assay 96 %, R:36, S:22 24, Cat. No. C-4901, Sigma)

Διαλύματα εργασίας

1. Διάλυμα 0.5 mM C₁₂-NBD-PC

Ποσότητα ίση με 1 mg C₁₂-NBD-PC διαλύεται σε 2.33 ml αιθανόλης σε γυάλινο βιδωτό σωλήνα. Διατηρείται στους -20 °C.

2. Διάλυμα 1 mM C₁₂-NBD-FA σε αιθανόλη

Ποσότητα ίση με 1 mg C₁₂-NBD-FA διαλύεται σε 2.64 ml αιθανόλης σε γυάλινο βιδωτό σωλήνα. Διατηρείται στους -20 °C.

3. Διάλυμα εργασίας 0.1 mM C₁₂-NBD-FA σε αιθανόλη

100 μl διαλύματος 1 mM C₁₂-NBD-FA αραιώνονται με αιθανόλη σε τελικό όγκο 1 ml. Το διάλυμα φυλάσσεται στους -20 °C.

4. Διάλυμα 0.5 M CaCl₂ pH=7.4

Ζυγίζονται 2.8 g CaCl₂ και διαλύονται σε 50 ml νερού. Το διάλυμα φυλάσσεται στους -20 °C.

5. Ρυθμιστικό διάλυμα 10 mM TrisHCl, 2 mM Ca²⁺ pH=7.4

0.1576 g TrisHCl διαλύονται σε 100 ml νερού. Προστίθενται 400 μl 0.5 M CaCl₂. Το διάλυμα φυλάσσεται στους 4 °C.

Πειραματική εκτέλεση

Λήψη φασμάτων διέγερσης και εκπομπής

Σε πλάκα micro-ELISA προσθέτω 250μl ρυθμιστικού διαλύματος PLA₂ και 2.5 μl C12-NBD-PC. Για τη λήψη των φασμάτων διέγερσης, η εκπομπή ρυθμίζεται στα 535 nm και το δείγμα διεγείρεται με σάρωση της περιοχής από 300-700 nm. Για τη λήψη των φασμάτων εκπομπής, η διέγερση ρυθμίζεται στα 475 nm και καταγράφεται η μεταβολή της έντασης εκπομπής φθορισμού στην περιοχή από 300-800 nm.

Έναρξη της αντίδρασης

Η συγκέντρωση του υποστρώματος ρυθμίζεται να είναι μεγαλύτερη της κρίσιμης μικυλλιακής συγκέντρωσης. Τα κυστίδια του υποστρώματος δημιουργούνται με την προσθήκη 2.5 μl του αιθανολικού διαλύματος 0.5 mM C12-NBD-PC σε 240 μl ρυθμιστικού διαλύματος 10 mM Tris-HCl, 2 mM Ca²⁺, pH 7.4 σε πλακίδιο micro-ELISA. Η έναρξη της αντίδρασης πραγματοποιείται με την προσθήκη 7-10 μl δείγματος (5μg πρωτεΐνης) . Η αντίδραση λαμβάνει χώρα σε θερμοκρασία 37°C, και η μεταβολή του φθορισμού του μίγματος καταγράφεται κάθε 20 λεπτά.

Χρήση εσωτερικού πρωτύπου

Στο τέλος της καταγραφής της μεταβολής του φθορισμού του μίγματος αντίδρασης προστίθενται 2 μ l του προτύπου αιθανολικού διαλύματος 0.1 mM C12-NBD-FA. Η προσθήκη ίδιας ποσότητας προτύπου επαναλαμβάνεται άλλες 2 φορές. Η μέση τιμή της αύξησης του φθορισμού που θα παρατηρηθεί μετά τις τρεις διαδοχικές προσθήκες αντιστοιχεί στο φθορισμό του εσωτερικού προτύπου.

Επεξεργασία των αποτελεσμάτων

Η ταχύτητα της αντίδρασης υπολογίζεται από την κλίση της ευθείας μεταβολής του φθορισμού συναρτήσει του χρόνου, που παρατηρείται από 30 min περίπου μέχρι 4 ώρες μετά την προσθήκη της πηγής του ενζύμου. Σχηματίζεται γραφική παράσταση της μεταβολής του φθορισμού συναρτήσει του χρόνου, χαράσσεται η βέλτιστη ευθεία που περνάει από τα σημεία και υπολογίζεται η εξίσωσή της που είναι της μορφής $y = ax + b$.

Η ενεργότητα της PLA₂ υπολογίζεται από τον ακόλουθο τύπο:

$$S = \frac{6 \times a \times 10^4}{5 \times DFA \times V_{\text{Δείγμα}}}$$

Όπου : **S** = Ενεργότητα της PLA₂ (nmoles FA/h/ml)

a = Η κλίση της ευθείας $y = ax + b$

DFA = Η διαφορά των τιμών του φθορισμού του C₁₂-NBD-FA που χρησιμοποιείται ως εσωτερικό πρότυπο

V_{δείγμα} = Ο όγκος του δείγματος που χρησιμοποιείται στην ενζυμική αντίδραση

Η ενζυμική ενεργότητα υπολογίζεται σε nmoles FA/h/mg πρωτεΐνης όταν η τιμή S που υπολογίζεται από τον προηγούμενο τύπο διαιρεθεί με την ποσότητα της πρωτεΐνης που αντιστοιχεί στον όγκο του δείγματος που χρησιμοποιήθηκε στην αντίδραση.

10. ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΙΣΟΕΝΖΥΜΩΝ ΦΩΣΦΟΛΙΠΑΣΗΣ A₂

10.1 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου

Αρχή της μεθόδου

Ηλεκτροφόρηση λέγεται το φαινόμενο κατά το οποίο ένα μόριο με καθαρό ηλεκτρικό φορτίο μετακινείται σε ηλεκτρικό πεδίο μέσω ενός φορέα. Η ταχύτητα μετακίνησης μιας πρωτεΐνης σε ένα ηλεκτρικό πεδίο εξαρτάται από την ένταση του ηλεκτρικού πεδίου, από το καθαρό φορτίο της πρωτεΐνης και τον συντελεστή τριβής. Η τριβή εξαρτάται από τη μάζα και το σχήμα του μορίου που μετακινείται, καθώς και από την πυκνότητα του μέσου. Ως μέσα μετακίνησης χρησιμοποιούνται τα πηκτώματα πολυακρυλαμιδίου, διότι αποτελούνται από χημικά ουδέτερες ενώσεις και το μέγεθος των πόρων τους μπορεί να ρυθμιστεί με την επιλογή διαφορετικών συγκεντρώσεων ακρυλαμιδίου. Τα μόρια μικρού μεγέθους, μετακινούνται εύκολα διαμέσου των πόρων του πηκτώματος, ενώ μόρια ενδιαμέσου μεγέθους μετακινούνται με διαφορετικές ταχύτητες. Στις περισσότερες περιπτώσεις, το δείγμα προς ανάλυση θερμαίνεται παρουσία ισχυρού ανιοντικού απορρυπαντικού, όπως το SDS. Τα μετουσιωμένα πολυπεπτίδια προσδένονται στο SDS και φορτίζονται αρνητικά. Λόγω του ότι το ποσοστό του SDS που προσδένεται στα πολυπεπτίδια είναι ανάλογο του μοριακού τους βάρους και ανεξάρτητο της αλληλουχίας τους, η μετακίνηση των συμπλοκών SDS-πολυπεπτιδίων εξαρτάται μόνο από το μέγεθός τους και επιτυγχάνεται με την εφαρμογή ηλεκτρικού ρεύματος μεταξύ των ηλεκτροδίων [150].

Υλικά- Συσκευές

1. Bromophenol Blue Sodium Salt ($C_{19}H_9Br_4O_5SNa$, MW:691.9, Cat. No. B-8026, Sigma)
2. Coomassie Brilliant Blue R-250 (Cat. No.161-0400, λ_{max} =550 nm, S:22, 24/25, Bio-Rad)
3. Ammonium Persulfate (APS) (Cat. No.161-0700, MW:228.20, R:8,22,37,42/43, S:17,24,26,43, Bio-Rad)
4. SDS (MW:288.38, Cat. No.161-0301, R: 22,36/38, S: 22, Bio-Rad)
5. Bis N, N'-Methylene-bis acrylamide (MW:154.17, Cat. No. 161-0200, 5 g, R: 22,37/38, S: 22,24/25, Bio-Rad)
6. Ακρυλαμίδιο (Acrylamide, C_3H_5NO , MW:71.08, R:45-46-24/25-48/23/24/25, S:53-45, Merck)

7. Γλυκερόλη (Glycerol, $\text{CH}_2\text{OHCHOHCH}_2\text{OH}$, MW:92.09, Assay 99.5 %, 2.5 L, Analar)
8. TEMED ($\text{C}_6\text{H}_{16}\text{N}_2$, MW:116.2, 99 %, Cat. No.T-8133, R:11-20/22-34, S:16-26-36/37/39-45, Sigma)
9. Γλυκίνη (Glycine, MW:75.07, Cat. 161-0718, Bio-Rad)
10. Μερκαπτοαιθανόλη (2-mercaptoethanol, $\text{C}_2\text{H}_6\text{OS}$, FW:78.13, R:23/24/25, S:45-26-36/37/39-23, Cat. No. M-3148, Sigma)
11. Πρότυπα Μοριακά Βάρη (Marker, Prestained protein Ladder 10-170 kDa, proteins are covalently coupled with a blue chromophore except for a reference one-72 kDa, coupled with an orange dye, Cat. No. #SM0671, Fermentas)
12. Trizma Base ($\text{C}_4\text{H}_{11}\text{NO}_3$, MW:121.1, Cat. No. T-1503, Sigma)
13. Μεθανόλη (Methanol, 1l=0.79 Kg, MW:32.04, R:11-23/24/25-39/23/24/25, S:7-16-36/37-45, Riedel-de Haen)
14. Οξικό Οξύ (Acetic acid glacial, MW:60.05, R:10-35, S:23-26-45, Carlo Erba)
15. Απόλυτη Αιθανόλη (Ethanol absolute, 1L=0.788 Kg, assay=99.8 %, MW:46.07, R:11, S:7-16, Riedel-de Haen)
16. Σελοφάν για το στέγνωμα των gels (PolyLabo)
17. Συσκευή ηλεκτροφόρησης (BioRad, Mini protean)

Διαλύματα

1. Ρυθμιστικό διάλυμα 1.5 M Trizma base pH 8.8

Ζυγίζονται 18.2 g Trizma base και διαλύονται σε 100 ml νερού. Ρυθμίζεται το pH στην τιμή 8.8 με διάλυμα 4 N HCl. Το διάλυμα φυλάσσεται στους 4 °C.

2. Ρυθμιστικό διάλυμα 0.5 M Trizma base pH 6.8

Ζυγίζονται 6.0 g Trizma base και διαλύονται σε 100 ml νερού. Ρυθμίζεται το pH στην τιμή 6.8 με διάλυμα 4 N HCl. Το διάλυμα φυλάσσεται στο στους 4 °C.

3. Διάλυμα 10 % SDS

10 g SDS διαλύονται σε 100 ml νερού. Το διάλυμα φυλάσσεται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.

4. Διάλυμα 10 % υπερθειικού αμμωνίου

0.1 g υπερθειικού αμμωνίου διαλύονται σε 1 ml νερού. Το διάλυμα παρασκευάζεται λίγο πριν τη χρήση του.

5. Διάλυμα 30 % ακρυλαμιδίου / bis ακρυλαμιδίου

29.2 g ακρυλαμιδίου και 0.8 g bis-ακρυλαμιδίου διαλύονται σε 100 ml νερού. Το διάλυμα διηθείται φυλάσσεται σε σκουρόχρωμο φιαλίδιο, στους 4°C.

6. Ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης (5x)

9 g Tris-base, 43.2 g γλυκίνης και 3 g SDS διαλύονται σε 600 ml νερού. Το διάλυμα φυλάσσεται στους 4°C. 60 ml διαλύματος αραιώνονται με 240 ml νερού λίγο πριν την χρήση του.

7. Διάλυμα κυανού της βρωμοφαινόλης 0.05 % (w/v)

2.5 mg κυανού της βρωμοφαινόλης διαλύονται σε 5 ml νερού.

8. Διάλυμα 12% αιθανόλης

Αναμιγνύονται 60 ml αιθανόλης με 440 ml νερού. Φυλάσσεται στους -4 °C.

9. Διάλυμα χρωματισμού 1 % κυανού του Coomassie R-250

2 g κυανού του Coomassie R-250 διαλύονται σε 200 ml νερού. Το διάλυμα αναδεύεται και διηθείται. Φυλάσσεται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.

10. Διάλυμα χρωματισμού πηκτώματος

Αναμιγνύονται 250 ml μεθανόλης, 50 ml οξικού οξέος και 62.5 ml διαλύματος χρωματισμού 1 % κυανού του Coomassie R-250. Ο όγκος ρυθμίζεται στα 500 ml.

11. Διάλυμα αποχρωματισμού

Αναμιγνύονται 300 ml μεθανόλης, 50 ml οξικού οξέος και 650 ml νερού.

12. Διάλυμα φόρτωσης των δειγμάτων

Αναμιγνύονται 0.3028 g Trizma base, 0.5 g SDS, 5 ml γλυκερόλης, 1 ml μερκαπτοαιθανόλης και 5 mg κυανού της βρωμοφαινόλης. Ο όγκος συμπληρώνεται στα 50 ml με νερό και το pH ρυθμίζεται στην τιμή 6.8. Το διάλυμα χωρίζεται ανά 0.5 ml σε πλαστικά σωληνάκια και φυλάσσονται στους -80 °C.

Πειραματική πορεία

Παρασκευή πηκτώματος διαδρομής (resolving gel)

Σε πλαστικό σωληνάριο corning αναμιγνύονται τα αντιδραστήρια με την σειρά που εμφανίζονται στον πίνακα. Για τις κυτοσολικές φωσφολιπάσες χρησιμοποιείται πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου 10 %, ενώ για τις εκκρινόμενες 15 %. Τα διαλύματα υπερθεϊκού αμμωνίου και TEMED είναι υπεύθυνα για την έναρξη του πολυμερισμού γι' αυτό και προστίθενται στο τέλος. Αμέσως μετά την προσθήκη των διαλυμάτων, μεταφέρουμε το μίγμα του πηκτώματος ανάμεσα στις δυο γυάλινες πλάκες τις συσκευής ηλεκτροφόρησης έως ότου φτάσει σε επίπεδο 0.5 εκατοστού κάτω από το κτένι. Στην συνέχεια προσθέτουμε νερό στην επιφάνεια του πολυακρυλαμιδίου για την προστασία του από την επαφή με τον αέρα. Το μίγμα αφήνεται να πολυμεριστεί σε θερμοκρασία δωματίου για περίπου 20 λεπτά.

Παρασκευή πηκτώματος επιστοίβασης (stacking gel)

Μετά τον πολυμερισμό του πηκτώματος διαδρομής, απομακρύνεται το νερό χρησιμοποιώντας διηθητικό χαρτί. Σε πλαστικό σωληνάριο corning αναμιγνύονται τα αντιδραστήρια για την παρασκευή του πηκτώματος επιστοίβασης, αφήνοντας πάλι τελευταία τα διαλύματα υπερθεϊκού αμμωνίου και TEMED. Αμέσως μετά την ανάμιξη το μίγμα τοποθετείται με πιπέτα πάνω από το πήκτωμα διαδρομής και στην συνέχεια προστίθεται το κτένι για την δημιουργία των θέσεων. Το μίγμα αφήνεται να πολυμεριστεί σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για μια περίπου 30 min. Μετά τον πολυμερισμό, αφαιρούνται οι γυάλινες πλάκες από την συσκευή στήριξης και τοποθετούνται στην συσκευή ηλεκτροφόρησης. Το κτένι αφαιρείται και στον χώρο ανάμεσα από τις γυάλινες πλάκες, στις θέσεις των δειγμάτων, αλλά και στον εξωτερικό χώρο του πηκτώματος, σε ύψος περίπου πέντε εκατοστών, τοποθετείται το ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης.

Οι ποσότητες των αντιδραστηρίων που απαιτούνται για την παρασκευή των πηκτωμάτων, αναγράφονται στον **Πίνακα 4**.

Πίνακας 4. Ποσότητες διαλυμάτων που απαιτούνται για την παρασκευή πηκτωμάτων για την ανίχνευση των ισοενζύμων της φωσφολιπάσης A_2 (εκκρινόμενης A_2 τύπου IIA, V και X, και κυτοσολικής PLA_2).

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ	ΠΗΚΤΩΜΑ ΔΙΑΔΡΟΜΗΣ 10% (cPLA ₂)	ΠΗΚΤΩΜΑ ΔΙΑΔΡΟΜΗΣ 15% (sPLA ₂)	ΠΗΚΤΩΜΑ ΕΠΙΣΤΟΙΒΑΣΗΣ (κοινό)
<i>H₂O</i>	4 ml	2.5 ml	6.1 ml
<i>1.3 Tris-HCl</i> <i>pH 8.8</i>	2.5 ml	2.5 ml	-
<i>0.5 Tris-HCl</i> <i>pH 6.8</i>	-	-	2.5 ml
<i>10% SDS</i>	100 μl	100 μl	100 μl
<i>Acrylamide/ Bis-</i> <i>acrylamide</i>	3.3 ml	5 ml	1.3 ml
<i>10% Ammonium</i> <i>persulfate</i>	100 μl	100 μl	100 μl
<i>TEMED</i>	10 μl	10 μl	10 μl

Προετοιμασία και τοποθέτηση δειγμάτων

Σε κατάλληλη ποσότητα δείγματος προστίθεται ποσότητα διαλύματος φόρτωσης σε πλαστικούς σωλήνες erppendorf. Ο μέγιστος όγκος που μπορεί να προστεθεί σε κάθε θέση είναι 20 μl που αντιστοιχεί περίπου σε 80 μg πρωτεΐνης. Τα δείγματα θερμαίνονται για 5 λεπτά στους 100°C. Μετά το βρασμό τους, τα δείγματα τοποθετούνται με ειδικό ρύγχος μεγάλης απόληξης στις αντίστοιχες θέσεις. Στην πρώτη θέση συνήθως τοποθετούνται τα πρότυπα μοριακά βάρη. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται στα 150 V για περίπου μια ώρα. Το πέρας της ηλεκτροφόρησης διαπιστώνεται όταν το μέτωπο της βαφής φτάσει στο τέλος του πηκτώματος της διαδρομής.

Χρώση πρωτεϊνών του πηκτώματος

Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης, οι πλάκες αποσυνδέονται από την συσκευή ηλεκτροφόρησης. Το πήκτωμα μεταφέρεται σε γυάλινο δοχείο που περιέχει το διάλυμα βαφής χρωματισμού και αφήνεται υπό ανάδευση, σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, για μισή ώρα ή έως ότου οι πρωτεϊνικές ζώνες χρωματιστούν κυανές.

Αποχρωματισμός του πήκτωματος

Στη συνέχεια το πήκτωμα μεταφέρεται σε γυάλινο δοχείο που περιέχει το διάλυμα αποχρωματισμού και αφήνεται υπό ανάδευση, σε θερμοκρασία περιβάλλοντος έως ότου μείνουν χρωματισμένες στον επιθυμητό βαθμό μόνο οι πρωτεϊνικές ζώνες.

Στέγνωμα και μονιμοποίηση του πήκτωματος

Το ειδικό σελοφάν εμβαπτίζεται στο διάλυμα 12 % αιθανόλης για 2-3 min και απλώνεται πάνω σε ένα πλαίσιο. Το πήκτωμα τοποθετείται πάνω στο σελοφάν, στο κέντρο του πλαισίου, προσεκτικά έτσι ώστε να μην υπάρχουν φυσαλίδες αέρα μεταξύ τους. Ένα ακόμη πλαίσιο στερεώνεται πάνω στο προηγούμενο με τη βοήθεια συνδετήρων. Τα πλαίσια με το πήκτωμα τοποθετούνται κάθετα και αφήνονται για 2-3 ημέρες, σε θερμοκρασία περιβάλλοντος ή για 12-16 ώρες σε ρεύμα αέρα.

10.2 Ανοσοαποτύπωση πρωτεϊνών**Αρχή μεθόδου**

Η μέθοδος της ηλεκτροφόρησης και η βαφή των πήκτωμάτων, είναι ιδανική για την εξέταση όλων των πρωτεϊνών που υπάρχουν στο δείγμα. Ωστόσο, δεν παρέχουν επαρκείς πληροφορίες για συγκεκριμένες πρωτεΐνες. Για την ανίχνευση μιας συγκεκριμένης πρωτεΐνης, είναι απαραίτητη η χρήση ανοσοχημικών μεθόδων. Για τον λόγο αυτό, αναπτύχθηκε μια μέθοδος μεταφοράς πρωτεϊνών από πήκτωμα σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης [151]. Η μέθοδος αυτή της ανοσοαποτύπωσης ή western blotting, χρησιμοποιεί αντισώματα για την ανίχνευση της παρουσίας, σχετικής ποσότητας και μοριακού βάρους μιας συγκεκριμένης πρωτεΐνης. Για την απεικόνιση του συμπλόκου πρωτεΐνης-αντισωμάτων χρησιμοποιούνται ενζυμικοί δείκτες, συζευγμένοι σε δευτερεύοντα αντισώματα, οι οποίοι στη συνέχεια ανιχνεύονται με την χρήση του κατάλληλου υποστρώματος μέσω χημειοφωταύγειας. Η ακτινοβολία που εκπέμπεται αποτυπώνεται σε φωτογραφικό φιλμ. Οι ζώνες αυτές στη συνέχεια μπορούν να αναλυθούν, για περαιτέρω πληροφορίες, με τη χρήση ειδικών υπολογιστικών προγραμμάτων.

Υλικά – Όργανα

1. Συσκευή ανοσοαποτύπωσης (Hoffer TE70 Semi-dry, Transpher unit, 80-6210-34, Serial No. 20098784, Amersham Biosciences Corp, USA)
2. Μembrάνη μεταφοράς πρωτεϊνών PVDF (Immuno-Blot PVDF membrane for N-terminal sequencing, Polyvinylidene difluoride, 140-150 μg πρωτεΐνης/ cm^2 μεμβράνης, Cat. No. 162-0177, 26 cm x 3.3 m, 1 roll, Bio-Rad)
3. Διηθητικό χαρτί Whatman
4. Blotter paper (14x16 cm, Cat. No. 80-6211-67, Amersham Biosciences)
5. Tween-20 ($d=1.095$, S:24/25, Cat. No. 27,434-8, Aldrich)
6. TrizmaBase ($\text{C}_4\text{H}_{11}\text{NO}_3$, FW:121.14, min 99.8 %, ερεθιστικό, Cat. No. T-1503, Sigma)
7. Διαλύματα χημειοφωταύγειας (Horseradish Peroxidase labelled antibodies, ECL 1 & 2 RPN 2209 AmershamBiosciences, UK, περιέχει τα εξής: Detection reagent 1, 125 ml, Cat. No. 1059243, Detection reagent 2, 125 ml, Cat. No. 1059250)
8. Κασετίνα εμφάνισης των φιλμ (LifeRay 24x30 cm, ID. No., LI000216034, Ferrania Incorp. Italy)
9. Φιλμ (Kodak Biomax Xar Film, Scientific Imaging Film for Biological Imaging, 13x18 cm, 50 sheets, Kodak Industrie, Cedex France)
10. Υγρό εμφάνισης του φιλμ (Kodak X-Ray Developer pH=9-12, Ref. Cat. No. 5070933, 20 l, Kodak Industrie, Cedex France)
11. Υγρό στερέωσης του φιλμ (Kodak X-Ray Fixer, Ref. Cat. No. 5071071, 20 l, Kodak Industrie, Cedex France)
12. Σκόνη αποβουτυρωμένου γάλακτος εμπορίου

Διαλύματα

1. Ρυθμιστικό διάλυμα μεταφοράς

7.2 g γλυκίνης, 1.5 g Tris-base και 5 ml 10 % SDS προστίθενται σε 400 ml νερού και αναδεύονται. Ο όγκος συμπληρώνεται στα 500 ml με την προσθήκη 100 ml μεθανόλης. Το διάλυμα φυλάσσεται στους 4°C.

2. Διάλυμα έκπλυσης TBS (10x)

24.2 g Tris-base και 80 g NaCl προστίθενται σε νερό συνολικού όγκου 1 lt και ρυθμίζεται το pH στα 7.6. Το διάλυμα φυλάσσεται στους 4°C.

3. Διάλυμα έκπλυσης εργασίας TBS-Tween 20

100 ml του διαλύματος έκπλυσης 10x αραιώνονται με νερό σε συνολικό όγκο 1 lt. Στη συνέχεια προστίθεται 1 ml Tween-20. Το διάλυμα φυλάσσεται στους 4°C.

4. Διάλυμα υγρού εμφάνισης φιλμ

50 ml υγρού εμφάνισης αραιώνονται με νερό σε συνολικό όγκο 200 ml. Το διάλυμα φυλάσσεται σε σκουρόχρωμο φιαλίδιο.

5. Διάλυμα υγρού μονιμοποίησης φιλμ

50 ml υγρού εμφάνισης αραιώνονται με νερό σε συνολικό όγκο 200 ml. Το διάλυμα φυλάσσεται σε σκουρόχρωμο φιαλίδιο.

Αντισώματα

▪ Πρωτεύοντα

- Goat anti-human cPLA2 (αραίωση 1:1000), (από Dr. L.Touqui)
- Rabbit anti-human sPLA2 τύπου IIA (αραίωση 1:1000), (Santa Cruz)
- Mouse anti-human sPLA2 τύπου V (αραίωση 1:1000), (από AstraZeneca)
- Rabbit anti-human sPLA2 τύπου X (αραίωση 1:1000), (από AstraZeneca)

▪ Δευτερεύοντα

- Rabbit anti-goat (αραίωση 1 : 7000), (Pierce)
- Goat anti-rabbit (αραίωση 1 : 7000), (Santa Cruz)
- Rabbit anti-mouse (αραίωση 1 : 7000), (Pierce)

Πειραματική πορεία

Προετοιμασία της μεμβράνης PVDF

Για την μεταφορά των πρωτεϊνών από το πήκτωμα, χρησιμοποιείται μεμβράνη PVDF. Η μεμβράνη πριν από την χρήση της, κόβεται σε διαστάσεις 5 cm X 8 cm, διαβρέχεται με μεθανόλη, στη συνέχεια εμβαπτίζεται πλήρως σε νερό και τελικά τοποθετείται σε διάλυμα μεταφοράς, έως την χρήση της. Η μεμβράνη θα πρέπει να διαχειρίζεται πάντα με γάντια.

Μεταφορά πρωτεϊνών

Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης, το πήκτωμα εμβαπτίζεται σε διάλυμα μεταφοράς. Στην συσκευή μεταφοράς τοποθετούνται εμβαπτισμένα με διάλυμα μεταφοράς και με την ακόλουθη σειρά : 2 χοντρά διηθητικά χαρτιά, 1 απλό, η μεμβράνη PVFD, το πήκτωμα, 1 απλό και 2 χοντρά διηθητικά χαρτιά. Προσοχή θα πρέπει να δοθεί ώστε να μην παγιδευτούν φυσαλίδες αέρα μεταξύ αυτών. Η μεταφορά επιτυγχάνεται στα 75 mA για ένα πήκτωμα ή στα 150 mA για δύο, για χρονικό διάστημα μεταξύ μίας και μιάμισης ώρας. Η διάρκεια μεταφοράς εξαρτάται από το μοριακό μέγεθος των πρωτεϊνών. Για μεγαλύτερου μοριακού μεγέθους, απαιτείται περισσότερος χρόνος. Μετά το πέρας της μεταφοράς το πήκτωμα τοποθετείται για χρώση για να διαπιστωθεί η αποτελεσματικότητα της διαδικασίας.

Σήμανση πρωτεϊνών στη μεμβράνη

Μετά το πέρας της μεταφοράς, η μεμβράνη επωάζεται για μία ώρα με διάλυμα 5 % γάλακτος- διαλύματος έκπλυσης για κορεσμό των περιοχών της μεμβράνης όπου δεν υπάρχουν πρωτεΐνες. Στη συνέχεια η μεμβράνη εκπλένεται και επωάζεται για 2 ώρες σε θερμοκρασία περιβάλλοντος με το κατάλληλο μίγμα αντισωμάτων σε διάλυμα TBS-Tween 20. Ακολουθούν 3 πεντάλεπτες εκπλύσεις και μια ώρα επώαση με το κατάλληλο δευτερεύον αντίσωμα σε διάλυμα TBS-Tween 20. Τέλος, η μεμβράνη εκπλένεται 3 φορές από 5 λεπτά.

Εμφάνιση πρωτεϊνών

Η μεμβράνη τοποθετείται σε διηθητικό χαρτί για την απομάκρυνση του διαλύματος, και επωάζεται για 2 λεπτά με το μίγμα χημειοφωταύγειας. Στη συνέχεια τοποθετείται στην ειδική κασετίνα εμφάνισης. Στον σκοτεινό θάλαμο, κόβεται κομμάτι φιλμ, όμοιων διαστάσεων με την μεμβράνη, τοποθετείται πάνω στην μεμβράνη, σημειώνονται τα άκρα της με μαρκαδόρο και η κασετίνα κλείνεται. Το φιλμ παραμένει στην κασετίνα μερικά λεπτά ή και παραπάνω εάν χρειαστεί. Στη συνέχεια το φιλμ τοποθετείται στο διάλυμα εμφάνισης για μερικά λεπτά έως ότου εμφανιστούν οι ζώνες, εκπλένεται καλά με νερό και τοποθετείται στο διάλυμα μονιμοποίησης. Τέλος, το φιλμ εκπλένεται με νερό και αφήνεται να στεγνώσει.

Επεξεργασία φιλμ με πρόγραμμα απεικόνισης

Για την επεξεργασία των αποτελεσμάτων, τα φιλμ σαρώνονται σε υπολογιστή και χρησιμοποιείται το πρόγραμμα ImageJ. Το πρόγραμμα αυτό είναι ειδικό για την ανάλυση και επεξεργασία εικόνων. Υπολογίζει στατιστικά στοιχεία περιοχών και εικονοστοιχείων pixels και σχεδιάζει ιστογράμματα των παραμέτρων. Όσον αφορά

την επεξεργασία των πρωτεϊνών, με το ειδικό εργαλείο, περικλείεται η περιοχή προς ανάλυση και δίνεται η εντολή για επεξεργασία. Με αυτό τον τρόπο παρέχονται πληροφορίες για την ζώνη της πρωτεΐνης, όπως εμβαδόν και πυκνότητα αυτής. Διατηρώντας σταθερό το εμβαδόν, το ειδικό εργαλείο μετακινείται για την μέτρηση της πυκνότητας της επόμενης ζώνης. Στο τέλος μετράται και μια καθαρή περιοχή, η πυκνότητα της οποίας αφαιρείται από την αντίστοιχη των πρωτεϊνών. Με αυτό τον τρόπο μετράται η ένταση και η πυκνότητα του σήματος της κάθε πρωτεΐνης, και στην συνέχεια μπορούν να επεξεργαστούν σε στατιστικό πρόγραμμα.

11. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ IL-6

Αρχή της μεθόδου

Η μέθοδος περιλαμβάνει ποσοτική ανοσοενζυμική τεχνική τύπου sandwich. Η πλάκα είναι επιστρωμένη με μονοκλωνικό αντίσωμα ειδικό για την IL-6. Τα πρότυπα και τα δείγματα τοποθετούνται στις κυψελίδες της πλάκας και οποιαδήποτε IL-6 δεσμεύεται από το ακινητοποιημένο αντίσωμα. Με την έκπλυση της πλάκας απομακρύνονται όλα τα συστατικά που δεν δεσμεύτηκαν και κατόπιν προστίθεται το πολυκλωνικό αντίσωμα κατά της IL-6 που είναι συζευγμένο με υπεροξειδάση αγριοραπανιού (horseradish peroxidase). Ακολουθεί έκπλυση της πλάκας για να απομακρυνθούν τα μη δεσμευμένα αντισώματα, προστίθεται διάλυμα υποστρώματος και χρώμα αναπτύσσεται σε αναλογία με την ποσότητα της IL-6 που έχει δεσμευτεί. Η ανάπτυξη του χρώματος σταματά και μετράται η έντασή του στα 450 nm.

Υλικά

1. KIT Human IL-6 Immunoassay (Quantikine,D6050)

12. ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ

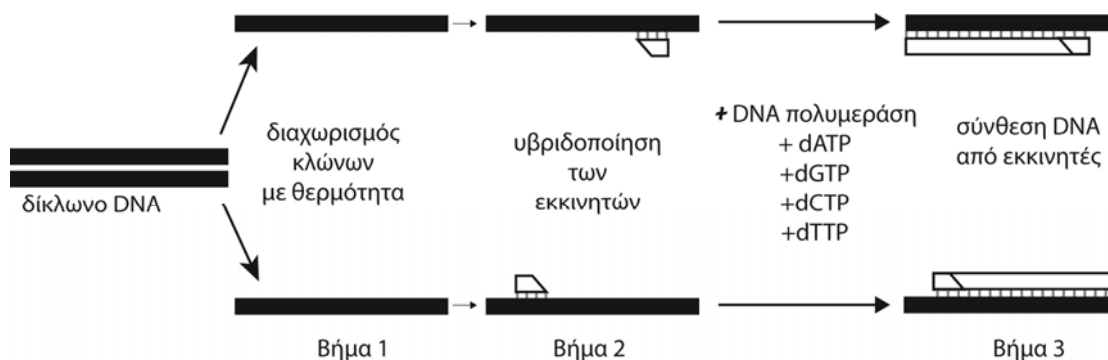
12.1 PCR

Αρχή της μεθόδου

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) είναι μια επαναστατική τεχνική *in vitro* σύνθεσης πολλών αντιγράφων μιας αλληλουχίας DNA (DNA στόχος) με τη βοήθεια ειδικών ενζύμων. Η τεχνική αυτή μιμείται το φυσιολογικό μηχανισμό του κυττάρου για τον πολλαπλασιασμό ειδικών τμημάτων DNA με τρόπο γρήγορο και αξιόπιστο. Η μεγάλη της αξία στηρίζεται στο ότι είναι μέθοδος γρήγορη, απλή, μικρού κόστους, αυτοματοποιημένη και απαιτεί μόνο ελάχιστες ποσότητες δείγματος. Κύριο χαρακτηριστικό αυτής της μεθόδου είναι η ιδιαίτερα μεγάλη ευαισθησία της. Η τεχνική αναπτύχθηκε το 1984 από τον Dr. Kary Banks Mullis, ερευνητή της εταιρείας Cetus Corporation, ο οποίος τιμήθηκε με το βραβείο Nobel το 1993 για τη συνεισφορά του αυτή.

Το DNA στόχος που πρόκειται να ενισχυθεί, προστίθεται σε δοκιμαστικό σωλήνα μαζί με DNA πολυμεράση, εκκινητικά μόρια (primers), δεοξυνουκλεοτίδια (dNTPs) και ρυθμιστικό διάλυμα αντίδρασης, και υπόκεινται σε μια εναλλαγή θερμοκρασιών. Το DNA στόχος είναι αυτό που θα αποτελέσει το πρότυπο DNA στην αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης με αφητηρία τους εκκινητές, δυο συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια (15-25 βάσεων), που έχουν δομή συμπληρωματική προς τις πλευρικές αλληλουχίες του DNA στόχου, το καθένα αντίστοιχα προς τον έναν κλώνο του στόχου και με αντίθετη κατεύθυνση. Κάθε κύκλος της PCR αποτελείται από τα εξής στάδια:

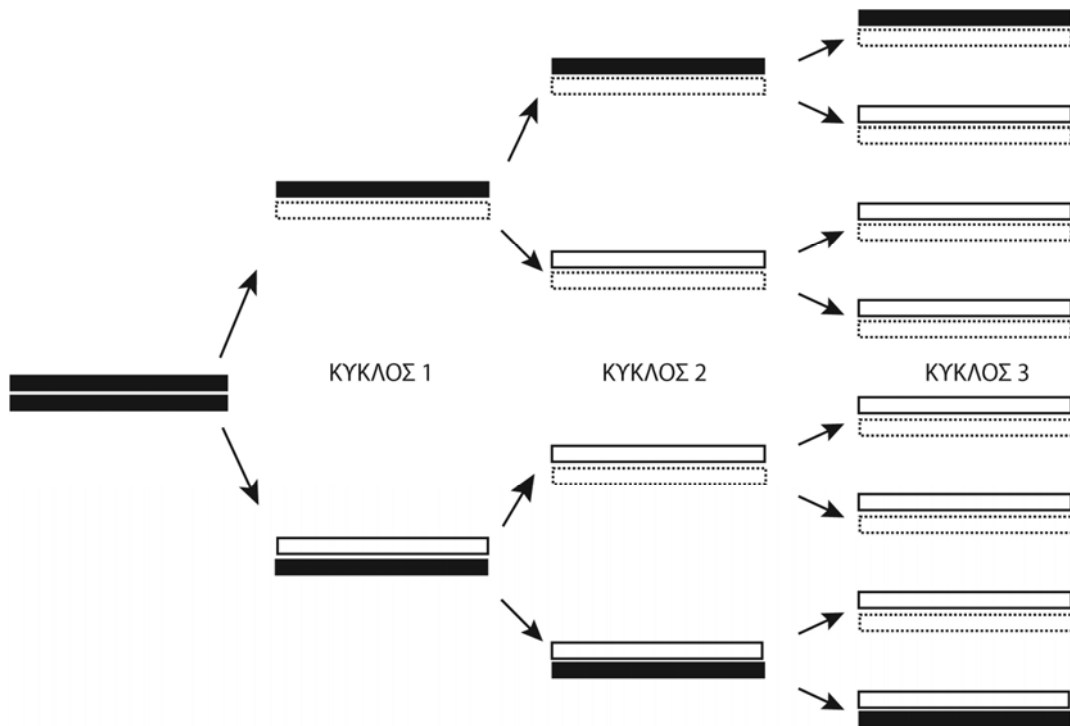
1. Αρχικά το DNA-στόχος μετουσιώνεται, με θέρμανση στους 95°C, για 15 sec - 2 min. Στο στάδιο αυτό οι δύο κλώνοι του DNA αποχωρίζονται ο ένας από τον άλλον.
2. Στη συνέχεια η θερμοκρασία ελαττώνεται στους 60°C για 30-60 sec. Στο στάδιο αυτό οι εκκινητές προσδένονται στους κλώνους του DNA στόχου.
3. Τέλος, ξεκινά η σύνθεση του νέου κλώνου του DNA, με την προσθήκη νουκλεοτιδίων, από το ένζυμο DNA πολυμεράση, στο 3' άκρο κάθε εκκινητή και η αλυσίδα επεκτείνεται. Η διαδικασία της επιμήκυνσης διαρκεί 1-2 min και πραγματοποιείται στους 72°C.



Σχήμα 14. Στάδια που ακολουθούνται κατά τη διάρκεια ενός κύκλου αντίδρασης PCR. Στάδιο I: μετουσίωση δίκλωνου DNA. Στάδιο II: Δέσμευση των εκκινητών στους κλώνους του DNA. Στάδιο III: Επιμήκυνση της αλυσίδας με την επίδραση της DNA-πολυμεράσης

Έτσι σχηματίζονται δυο καινούριες αλυσίδες συμπληρωματικές προς αυτές των δυο κλώνων του πρότυπου DNA, και το DNA στόχος έχει κατ' αυτόν τον τρόπο διπλασιαστεί. Η σειρά των τριών σταδίων, μετουσίωσης (denaturation), υβριδισμού των εκκινητών (annealing) και επέκτασης των εκκινητών με την σύνθεση καινούριου κλώνου (extension), αποτελούν έναν κύκλο της αντίδρασης PCR. Ο επόμενος κύκλος ξεκινά πάλι από το στάδιο 1 όπου γίνεται μετουσίωση των σχηματιζόμενων μορίων DNA (**Σχήμα 14**).

Στο τέλος του πρώτου κύκλου της αντίδρασης οι κλώνοι του DNA-στόχου είναι πλέον τέσσερις και αποτελούν τα πρότυπα για τη σύνθεση νέων κλώνων DNA στο 2^ο κύκλο. Στο τέλος του 2^{ου} κύκλου οι κλώνοι θα είναι οκτώ και αυξάνοντας τον αριθμό των κύκλων αυξάνει εκθετικά και ο αριθμός ανατύπων του στόχου DNA, επειδή οι κλώνοι που σχηματίζονται χρησιμοποιούνται ως πρότυπο στον επόμενο κύκλο. Με αυτόν τον τρόπο επιτυγχάνεται πολλαπλασιασμός του DNA στόχου, 2ⁿ όπου n ο αριθμός των κύκλων (**Σχήμα 15**).



Σχήμα 15. Πολλαπλασιασμός τμημάτων DNA σε PCR αντίδραση. Μετά το τέλος του 1^{ου} κύκλου το δίκλωνο DNA έχει διπλασιαστεί, μετά το τέλος του 2^{ου} κύκλου έχει τετραπλασιαστεί, μετά το τέλος του 3^{ου} κύκλου έχει οκταπλασιαστεί, ακολουθώντας εκθετική αύξηση της μορφής 2^n , όπου n ο αριθμός των κύκλων.

12.2 Συστατικά της αντίδρασης PCR

➤ Taq DNA πολυμεράση

Το ένζυμο DNA πολυμεράση είναι αυτό που καταλύει την επέκταση των εκκινητών. Χρησιμοποιώντας την θερμο-ανθεκτική Taq DNA πολυμεράση είναι δυνατή η χρήση υψηλότερων θερμοκρασιών για τον υβριδισμό των εκκινητών και την επέκταση της αλληλουχίας, με μειωμένη μη ειδική πρόσδεση των εκκινητών, και αυξάνοντας έτσι την αποτελεσματικότητα και την απόδοση του προϊόντος. Το ένζυμο αυτό παρουσιάζει 5' → 3' δράση εξωνουκλεάσης.

➤ Ολιγονουκλεοτίδια - Εκκινητές

Το μήκος των ολιγονουκλεοτιδίων που θα χρησιμοποιηθούν ως εκκινητές κυμαίνεται, μεταξύ 20-30 νουκλεοτιδίων και πάντα πρέπει να αποτελούνται από τουλάχιστον 16 νουκλεοτίδια. Οι αλληλουχίες αυτές πρέπει να περιέχουν 40-60% γουανίνη και κυτοσίνη (G+C) και δεν πρέπει να είναι συμπληρωματικές, έτσι ώστε να αποφευχθεί ο σχηματισμός διμερών κατά την διάρκεια της PCR. Η θερμοκρασία υβριδισμού των εκκινητών εκτιμάται κάθε φορά βάση των σημείων τήξης τους, τα οποία όμως σημεία πρέπει να είναι παρόμοια για τους δυο εκκινητές.

➤ dNTPs

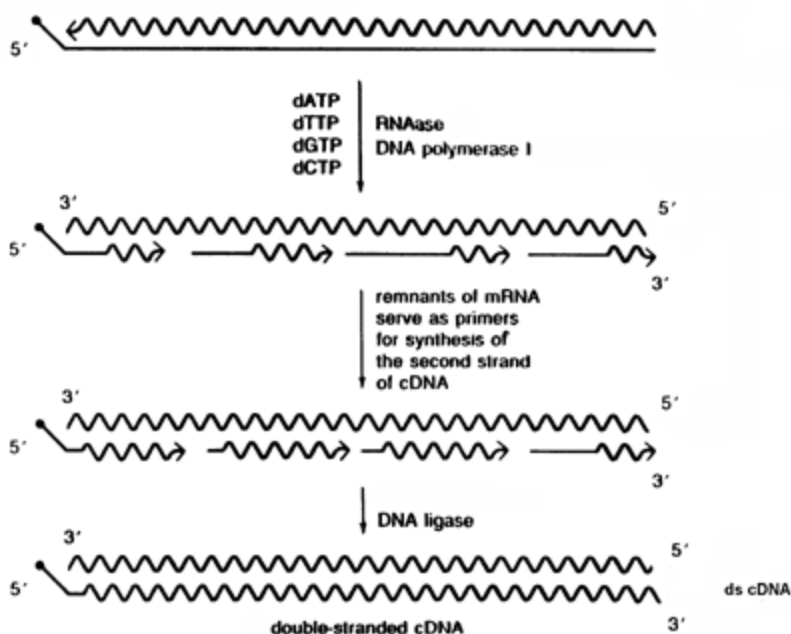
Τα dNTPs χρησιμοποιούνται σε συγκεντρώσεις κορεσμού (0.2 mM το καθένα).

➤ Αλληλουχίες-στόχοι

Το DNA που περιέχει την αλληλουχία-στόχο μπορεί να προστεθεί στο μείγμα αντίδρασης της PCR σε μονο- αλλά και δίκλωνη μορφή. Το μέγεθος του DNA δεν αποτελεί κρίσιμο παράγοντα, αλλά έχειδειχθεί ότι είναι καλύτερο μεγάλα τμήματα DNA να χρησιμοποιούνται, αφού πρώτα γίνει η διάσπασή τους με διάφορα ένζυμα περιορισμού. Η συγκέντρωση της αλληλουχίας-στόχου μέσα στο τμήμα του DNA που χρησιμοποιείται δεν είναι συχνά υπό τον έλεγχο του ερευνητή. Θα ήταν ωφέλιμο, πριν από την πραγματοποίηση των πειραμάτων, να γινόταν μια σειρά πειραμάτων ελέγχου με διαφορετικά ποσά των γνωστών αλληλουχιών έτσι ώστε να ελεγχθεί η ευαισθησία της αντίδρασης.

12.3 Real Time PCR

Η τεχνική PCR μπορεί να εφαρμοστεί και για τη γονιδιακή επέκταση RNA. Επειδή όμως, οι θερμο-ανθεκτικές πολυμεράσες που χρησιμοποιούνται στη διαδικασία της βασικής PCR απαιτούν ένα εκμαγείο DNA, πρέπει πρώτα το RNA να μετατραπεί σε συμπληρωματικό του DNA (cDNA) (**Σχήμα 16**). Αυτό γίνεται με τη δράση του ενζύμου ανάστροφης μεταγραφάσης. Με την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης με ανάστροφη μεταγραφάση (RT-PCR) είναι δυνατή η γονιδιακή επέκταση RNA ιών.



Σχήμα 16. Αντίστροφη μεταγραφή και παραγωγή cDNA. Η DNA πολυμεράση I, έχοντας ως εκμαγείο το μονόκλωνο RNA, συνθέτει έναν δεύτερο συμπληρωματικό κλώνο, σχηματίζοντας το cDNA.

Πειραματική εκτέλεση

Απομόνωση RNA

Υλικά – Όργανα

1. Total RNA Isolation Nucleospin RNA II Kit (Macherey-Nagel)
2. Μερκαπτοαιθανόλη (2-mercaptoethanol, C_2H_6OS , FW:78.13, R:23/24/25, S:45-26-36/37/39-23, Cat. No. M-3148, Sigma)
3. Φυγόκεντρος για erpedorfs (MIKRO 20 Hettich zentrifugen)

Η απομόνωση του RNA από τα δείγματα κυττάρων A549 περιλαμβάνει τα εξής στάδια:

- Απομόνωση κυττάρων: 2×10^6 κύτταρα απομονώνονται με φυγοκέντρωση (500g, 10 min) σε αποστειρωμένα, RNAase-free πλαστικά σωληνάκια. Το υπερκείμενο της φυγοκέντρωσης απορρίπτεται.

- Λύση των κυττάρων: προσθέτουμε 350μl RA1 (από kit) και 3.5μl β-mercaptoethanol στο ίζημα των κυττάρων. Αναδεύουμε σε vortex.
- Διήθηση των λυμένων κυττάρων: Μεταφέρουμε το ίζημα στο *NucleoSpin Filter Unit* (από kit). Τοποθετούμε το NucleoSpin Filter Unit σε ένα σωληνάκι συλλογής και φυγοκεντρούμε για 1min στα 11,000 x g (13000 rpm).
- Καθορισμός συνθηκών πρόσδεσης RNA: αφαιρούμε το NucleoSpin Filter Unit και προσθέτουμε 350μl αιθανόλη (70%) στο σωληνάκι συλλογής. Ακολουθεί καλή ανάδευση.
- Πρόσδεση RNA: Τοποθετούμε το *NucleoSpin RNAIi Column* (από kit) σε ένα σωληνάκι φυγοκέντρωσης των 2ml (από kit). Αδειάζουμε το ίζημα στο *NucleoSpin RNAIi column* και φυγοκεντρούμε για 30sec στα 11,000 x g (13000 rpm). Τοποθετούμε το NucleoSpin RNAIi column πάνω σε καινούργιο αποστειρωμένο σωληνάκι των 2ml.
- Αφαλάτωση μεμβράνης silica: προσθέτουμε 350μl MDB (Membrane Desalting Buffer, από kit) και φυγοκεντρούμε για 60 sec στα 11,000 x g (13000 rpm).
- Πέψη DNA: ετοιμάζουμε DNase reaction mixture σε αποστειρωμένο σωληνάκι μικροφυγοκέντρωσης και προσθέτουμε 10μl reconstituted rDNase (από kit) και 90μl Reaction buffer for rDNase (από kit). Προσθέτουμε το μίγμα στο *NucleoSpin RNAIi column* και το επωάζουμε σε θερμοκρασία δωματίου για 15 min.
- 1^η πλύση – ξήρανση μεμβράνης: προσθέτουμε 200μl buffer RA2 (από kit) στο *NucleoSpin RNAIi column*. Φυγοκεντρούμε για 30 sec στα 11,000 x g (13000 rpm), τοποθετούμε το *NucleoSpin RNAIi column* σε καινούργιο αποστειρωμένο σωληνάκι των 2ml.
- 2^η πλύση: Προσθέτουμε 600μl buffer RA3 (από kit) στο *NucleoSpin RNAIi column*. Φυγοκεντρούμε για 30 sec στα 11,000 x g (13000 rpm).
- 3rd Wash: Προσθέστε 250μl buffer RA3 (από kit) στο *NucleoSpin RNAIi column*. Φυγοκεντρούμε για 2 min στα 11,000 x g (13000 rpm) μέχρι να στεγνώσει τελείως το *NucleoSpin RNAIi column*.
- Τοποθετούμε το *NucleoSpin RNAIi column* πάνω σε νέο σωληνάκι μικροφυγοκέντρωσης nuclease free (από kit).
- Έκλυση καθαρού RNA: Διαχωρίζουμε το RNA με έκλυση με 60μl H₂O (RNase free, από kit) και φυγοκεντρούμε για 1min στα 11,000 x g (13000 rpm). Το RNA που εκλύεται μετά από αυτή τη διαδικασία είναι περίπου 60 μg.

Ποσοτικός προσδιορισμός RNA

Υλικά – Όργανα

1. Φωτόμετρο SHIMADZU UV-1601
2. Γυάλινες κυψελίδες Q

Για τον ποσοτικό προσδιορισμό του απομονωμένου RNA ακολουθείται η εξής διαδικασία:

- Ποσότητα ίση με 10 μ l από το απομονωμένο RNA αναμιγνύεται με 1490 μ l νερό (RNase free) σε σωληνάκι erppendorf (αραίωση 150 φορές).
- Χρησιμοποιούμε 2 γυάλινες κυψελίδες του 1 ml, ειδικές για φωτομέτρηση στο υπεριώδες (κυψελίδες Q). Στη μία κυψελίδα τοποθετούμε το αραιωμένο διάλυμα RNA και στην άλλη νερό.
- Μετράμε την απορρόφηση στα 260nm αφού προηγουμένως έχουμε μηδενίσει σε αυτό το μήκος κύματος με την κυψελίδα που περιέχει το νερό.
- Επαναλαμβάνουμε την ίδια διαδικασία στα 280 nm, χωρίς να αδειάσουμε τις δυο κυψελίδες, αρχικά μηδενίζοντας με το νερό και στη συνέχεια μετρώντας την απορρόφηση.
- Υπολογίζουμε τη συγκέντρωση του διαλύματος RNA θεωρώντας ότι τα 40 μ g RNA/ ml δίνουν απορρόφηση ίση με τη μονάδα στα 260nm, με βάση τον ακόλουθο τύπο:

$\text{Περιεκτικότητα απομονωμένου RNA} = \text{OD}_{260} \times 40 \times \text{αραίωση}$
--

Ο λόγος $\text{OD}_{260} / \text{OD}_{280}$ δίνει πληροφορίες για την καθαρότητα του δείγματος και θα πρέπει να είναι μεγαλύτερος ή ίσος του 1,9.

RT – PCR

Υλικά – Όργανα

1. Αποστειρωμένα σωληνάκια για PCR (Certified PCR Performance Tested SARSTEDT 72.737.002)
2. Biorad iScript SYBR Green RT – PCR kit (Biorad 170-8893)
3. Primer sPLA₂ IIA (Hs-PLA2G2A-2-SG Qiagen QT 01476097)
4. Primer GAPDH (Hs-GAPDH-2-SG Qiagen QT 01192646)
5. Primers για PLA2G2A (LAB SUPPLIES)
6. Mini Opticon Real time PCR System (Biorad)

Για την παρασκευή cDNA χρησιμοποιήθηκαν από κάθε δείγμα 100 ng RNA ενώ οι συγκεντρώσεις των εκκινητών (primers) ήταν 30 nM. Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε συνολικό όγκο 25 µl. Η RT-PCR πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με πρωτόκολλο κατά το οποίο ο θερμοκυκλοποιητής ρυθμίζεται για 10 min στους 50°C για την πραγματοποίηση της αντίστροφης μεταγραφής με ενεργοποίηση της αντίστροφης μεταγραφάσης και στη συνέχεια 5 min στους 95°C για την ενεργοποίηση της DNA πολυμεράσης και απενεργοποίηση της αντίστροφης μεταγραφάσης, 40 sec στους 94°C για τη μετουσίωση των κλώνων του σχηματιζόμενου cDNA, 40 sec στη θερμοκρασία υβριδοποίησης ανάλογα με τον εκκινητή και 1 min στους 72°C για την επέκταση των κλώνων. Ο αριθμός των κύκλων που πραγματοποιήθηκαν σε κάθε αντίδραση κυμαινόταν ανάλογα με τις απαιτήσεις των εκκινητών.

Οι αλληλουχίες των cDNA αναλύθηκαν ημιποσοτικά έχοντας ως γονίδιο αναφοράς την δεϋδρογονάση της 3-φωσφορικής γλυκεραλδεϋδης (GAPDH), η οποία είναι ένα μόριο που εκφράζεται σταθερά από τα κύτταρα και τους ιστούς (housekeeping gene).

Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της RT – PCR ανάλυσης σε πήκτωμα αγαρόζης

Υλικά – Όργανα

1. Συσκευή ηλεκτροφόρησης (omniPAGE multiSUB Cleaver Scientific Ltd)
2. Αγαρόζη (Merck K37124401)
3. Trizma Base (C₄H₁₁NO₃, MW:121.1, Cat. No. T-1503, Sigma)

4. Οξικό Οξύ (Acetic acid glacial, MW:60.05, R:10-35, S:23-26-45, Carlo Erba)
5. EDTA
6. Gel loading Dye Blue 6x (Biolabs B70215)
7. DNA ladder (Biolabs N32315)
8. 3UV Transilluminator

Διαλύματα

1. Διάλυμα TAE (Tris / Acetate / EDTA) 50x

2. Διάλυμα 10mg/ml βρωμιούχο αιθίδιο

Ο έλεγχος των προϊόντων της RT-PCR έγινε με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 2% (w/v) σε ρυθμιστικό διάλυμα Tris – οξικό οξύ - EDTA, pH 8.0 (TAE), που περιείχε βρωμιούχο αιθίδιο (2,5 μ L βαφής / 50 mL TAE). Η βαφή αυτή είναι μια υψηλά ευαίσθητη φθορίζουσα ουσία για την ανίχνευση νουκλεϊκών οξέων σε πηκτώματα αγαρόζης και πολυακρυλαμιδίου. Συμπλοκοποιείται στην διπλή έλικα του DNA και με αυτόν τον τρόπο το καθιστά ορατό κάτω από UV ακτινοβολία.

Τα δείγματα αναμείχθηκαν με ποσότητα βαφής φόρτωσης των δειγμάτων, όπου η συνιστώμενη ποσότητα ενδείκνυται σε ένα μέρος βαφής για κάθε πέντε μέρη διαλύματος DNA.

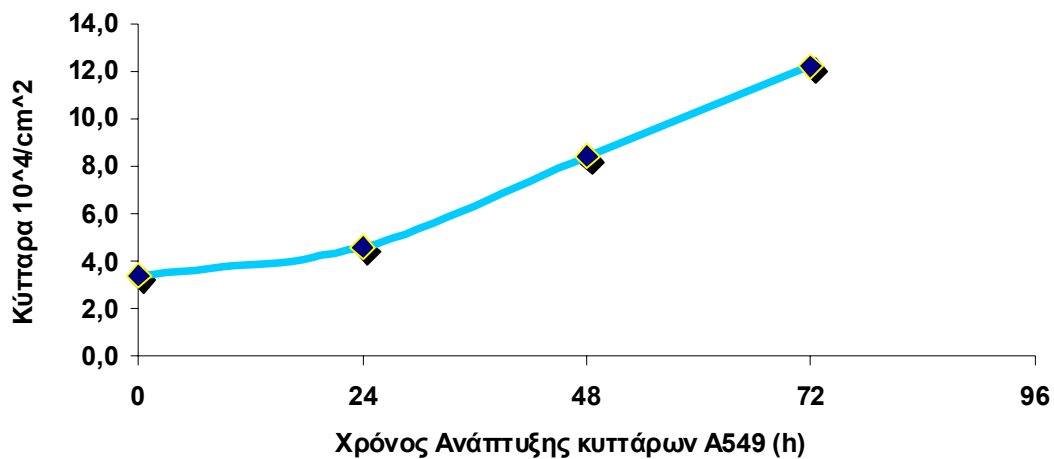
Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε εφαρμόζοντας ηλεκτρικό πεδίο 100 V για 30 min, ενώ τόσο η άνοδος όσο και η κάθοδος ήταν βυθισμένες σε ρυθμιστικό διάλυμα 0.5 M TAE. Η ανίχνευση των προϊόντων της PCR αντίδρασης έγινε με τοποθέτηση των πηκτωμάτων πάνω σε λάμπα υπεριώδους ακτινοβολίας. Η φωτογράφιση των πηκτωμάτων έγινε με Kodac κάμερα ενώ η ανάλυση, και η επεξεργασία των ζωνών στα πηκτώματα αγαρόζης έγιναν βάση του προγράμματος ανάλυσης εικόνας Kds1 (Kodac digital science).

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

1. Καμπύλη ανάπτυξης των κυττάρων A549

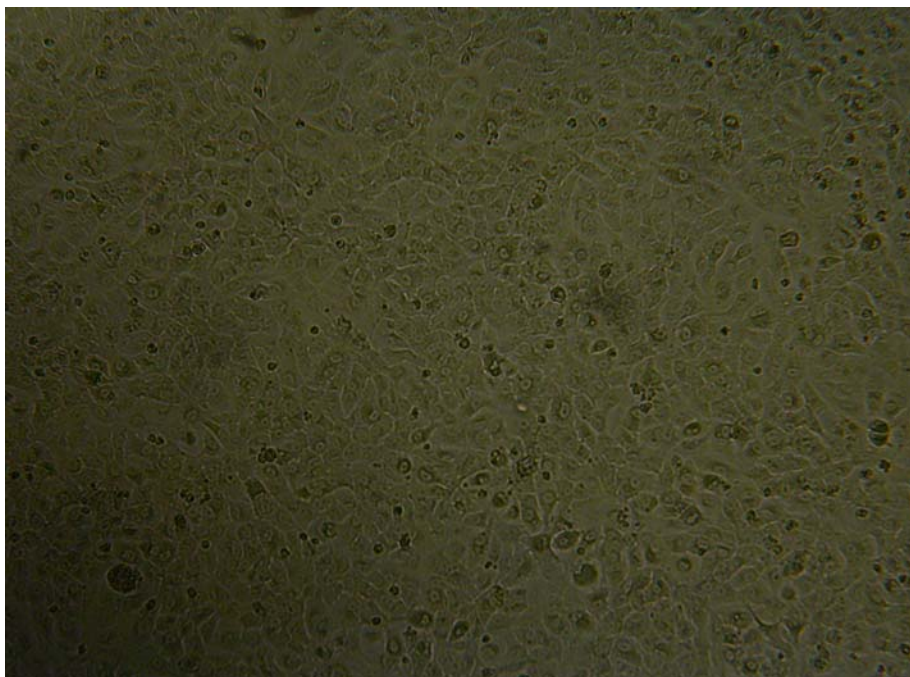
Πραγματοποιήθηκε παρακολούθηση της ανάπτυξης των κυττάρων A549 σε τρυβλία με ελαστική μεμβράνη και τρυβλία απλής μεμβράνης ίδιας διαμέτρου, μετρώντας τον αριθμό των κυττάρων. Η καλλιέργεια ετοιμάστηκε με 8×10^5 κύτταρα/ml. Η καμπύλη ανάπτυξης φαίνεται στο ακόλουθο **Σχήμα 17**.



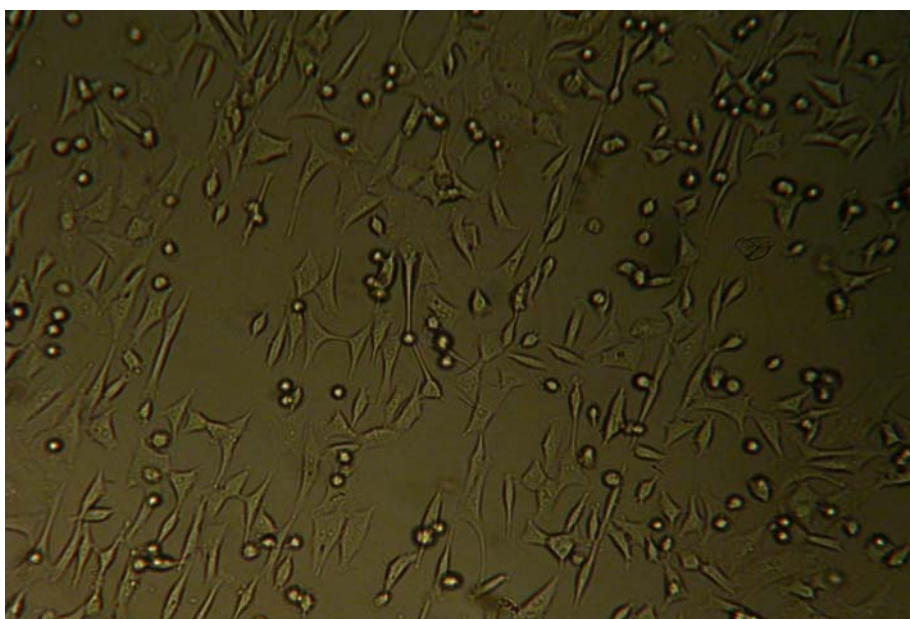
Σχήμα 17. Καμπύλη ανάπτυξης κυττάρων A549 σε τρυβλία απλής μεμβράνης (5 cm), ίδιων διαστάσεων με τα αντίστοιχα της ελαστικής μεμβράνης.

Από την καμπύλη ανάπτυξης διαπιστώνεται ο διπλασιασμός των κυττάρων κάθε 24 ώρες για τα κύτταρα A549. Σε αντίστοιχες μετρήσεις που έγιναν υπό τις ίδιες συνθήκες σε τρυβλία με ελαστική μεμβράνη διαπιστώθηκαν παρόμοιες μετρήσεις.

Στο παρακάτω σχήμα φαίνεται η μορφή των προσκολλημένων κυττάρων σε τρυβλίο με ελαστική μεμβράνη, χωρίς stretch (**Σχήμα 18**) και μετά από stretch αντίστοιχα (**Σχήμα 19**).



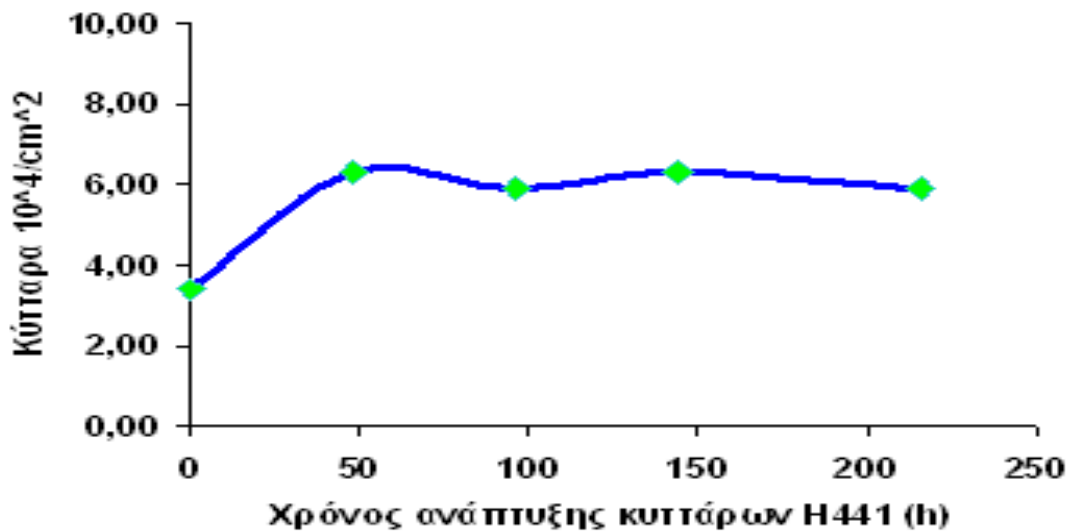
Σχήμα 18. Μορφή κυττάρων A549 μετά από την προσκόλλησή τους σε απλό τρυβλίο.



Σχήμα 19. Μορφή κυττάρων A549 μετά από stretch σε τρυβλίο με ελαστική μεμβράνη.

2. Καμπύλη ανάπτυξης κυττάρων H441

Πραγματοποιήθηκε παρακολούθηση της ανάπτυξης των κυττάρων σε τρυβλία με ελαστική μεμβράνη και σε τρυβλία απλής μεμβράνης ίδιας διαμέτρου μετρώντας τον αριθμό των κυττάρων. Η καλλιέργεια των κυττάρων H441 ετοιμάστηκε με 8×10^5 κύτταρα/ml. Η καμπύλη ανάπτυξης φαίνεται στο ακόλουθο **Σχήμα 20**.



Σχήμα 20. Καμπύλη ανάπτυξης κυττάρων H441 σε τρυβλία απλής μεμβράνης (5 cm), ίδιων διαστάσεων με τα αντίστοιχα της ελαστικής μεμβράνης.

Από την καμπύλη ανάπτυξης διαπιστώνεται ο διπλασιασμός των κυττάρων κάθε 48 ώρες για τα H441 κύτταρα. Στην καμπύλη ανάπτυξης των κυττάρων H441 υπήρχαν πειραματικά σφάλματα στη μέτρηση των κυττάρων οπότε και κατά τη χρονική στιγμή 96 ώρες δεν υπολογίστηκε ο σωστός αριθμός κυττάρων.

Επίσης, πρέπει να αναφερθεί ότι τα κύτταρα H441 παρουσίασαν ανικανότητα προσκόλλησης στην ελαστική μεμβράνη γι' αυτό και αποκλείστηκαν από τη μελέτη.

3. Επίδραση μηχανικής διάτασης και LPS σε κύτταρα A549

Οι συνθήκες που μελετήθηκαν ήταν οι εξής : control, LPS, stretch και LPS+stretch. Οι χρονικές διάρκειες του stretch που μελετήθηκαν ήταν 30 min, 1, 4 και 24 h ενώ η επίδραση του LPS ήταν 24 h.

3.1 Επίπεδα πρωτεΐνης

A. Στο ομογενοποίημα των κυττάρων

Στις πειραματικές μας συνθήκες διαπιστώθηκε ότι το πρωτεϊνικό περιεχόμενο δεν επηρεάζεται από τη μηχανική διάταση και/ή την επώαση των κυττάρων με LPS (Πίνακας 5). Επομένως, σε κάθε περίπτωση και υπό την επίδραση του κάθε παράγοντα δεν υπάρχουν στατιστικά σημαντικές μεταβολές.

Πίνακας 5. Πρωτεϊνικό περιεχόμενο σε ομογενοποίημα κυττάρων A549. Τα αποτελέσματα αντιπροσωπεύουν το μέσο όρο (MO) $\pm$ SEM 3 διαφορετικών πειραμάτων. Δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές μεταβολές.

Πρωτεΐνη ($\mu\text{g/ml}$)	30 min	1 h	4 h	24 h
Control	605 $\pm$ 28	599 $\pm$ 23	593 $\pm$ 32	615 $\pm$ 28
LPS	618 $\pm$ 21	594 $\pm$ 24	603 $\pm$ 38	597 $\pm$ 22
Stretch	612 $\pm$ 25	613 $\pm$ 33	613 $\pm$ 34	614 $\pm$ 26
Stretch+LPS	615 $\pm$ 32	618 $\pm$ 34	616 $\pm$ 38	612 $\pm$ 26

B. Στο υπερκείμενο των καλλιιεργειών

Όσον αφορά τις μετρήσεις του πρωτεϊνικού περιεχομένου στα υπερκείμενα των καλλιιεργειών διαπιστώθηκε ότι επίσης δεν υπάρχουν στατιστικά σημαντικές μεταβολές. Οι πειραματικές τιμές φαίνονται στον Πίνακα 6.

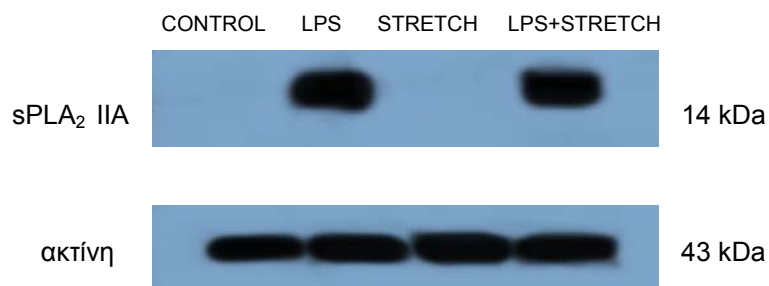
Πίνακας 6. Πρωτεΐνη στα υπερκείμενα καλλιιεργειών κυττάρων A549. Τα αποτελέσματα αντιπροσωπεύουν το $MO \pm SEM$ 4 διαφορετικών πειραμάτων. Δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές μεταβολές.

Πρωτεΐνη ($\mu\text{g/ml}$)	30 min	1 h	4 h	24 h
Control	238 ± 26	211 ± 18	231 ± 24	195 ± 22
LPS	256 ± 23	222 ± 26	214 ± 20	208 ± 18
Stretch	232 ± 28	198 ± 21	194 ± 18	212 ± 20
Stretch+LPS	234 ± 21	238 ± 26	190 ± 21	220 ± 19

3.2 Ανοσοανίχνευση ισοενζύμων PLA_2

- Εκκρινόμενη φωσφολιπάση A_2 τύπου IIA ($sPLA_2$ IIA) στα κύτταρα A549**

Πραγματοποιήθηκε ανίχνευση της εκκρινόμενης φωσφολιπάσης A_2 τύπου IIA στα κύτταρα A549 με τη μέθοδο της ανοσοαποτύπωσης. Η ισοφόρτωση των δειγμάτων επιβεβαιώθηκε με προσδιορισμό πρωτεΐνης και ανίχνευση ακτίνης. Παρατηρήθηκε παραγωγή της εκκρινόμενης φωσφολιπάσης A_2 τύπου IIA μόνο στα δείγματα που είχαν ενεργοποιηθεί με LPS, ενώ δεν παρατηρήθηκαν διαφορές μεταξύ των δειγμάτων LPS και LPS+stretch (**Γράφημα 1**). Η εικόνα είναι παρόμοια για όλες τις χρονικές διάρκειες του stretch (30 min, 1 h, 4 h και 24 h).



Γράφημα 1. Ανίχνευση επιπέδων εκκρινόμενης PLA_2 IIA σε κύτταρα A549. Η ισοφόρτωση των δειγμάτων επιβεβαιώθηκε με ανίχνευση ακτίνης. Η επανάληψη των πειραμάτων πραγματοποιήθηκε 3 φορές με παρόμοια αποτελέσματα.

- **Εκκρινόμενη φωσφολιπάση A₂ τύπου IIA (sPLA₂ IIA) στα υπερκείμενα των κυττάρων A549**

Ακολούθησε ανίχνευση της εκκρινόμενης φωσφολιπάσης A₂ τύπου IIA στα υπερκείμενα των κυττάρων A549 με τη μέθοδο της ανοσοαποτύπωσης. Παρατηρήθηκε έκκριση της εκκρινόμενης φωσφολιπάσης A₂ τύπου IIA μόνο στα δείγματα που είχαν ενεργοποιηθεί με LPS, ενώ δεν παρατηρήθηκαν διαφορές μεταξύ των δειγμάτων LPS και LPS+stretch (**Γράφημα 2**). Η εικόνα είναι παρόμοια για όλες τις χρονικές διάρκειες του stretch (30 min, 1 h, 4 h και 24 h).



Γράφημα 2. Ανίχνευση επιπέδων εκκρινόμενης PLA₂ IIA σε υπερκείμενα κυττάρων A549. Η επανάληψη των πειραμάτων πραγματοποιήθηκε 3 φορές με παρόμοια αποτελέσματα.

- **Εκκρινόμενη φωσφολιπάση A₂ τύπου V (sPLA₂ V)**

Η εκκρινόμενη φωσφολιπάση A₂ τύπου V δεν ανιχνεύθηκε ούτε στα κύτταρα αλλά ούτε και στα υπερκείμενα των κυττάρων A549.

- **Εκκρινόμενη φωσφολιπάση A₂ τύπου X (sPLA₂ X)**

Η εκκρινόμενη φωσφολιπάση A₂ τύπου X δεν ανιχνεύθηκε ούτε στα κύτταρα αλλά ούτε και στα υπερκείμενα των κυττάρων A549.

4. Επίδραση μηχανικής διάτασης και LPS σε κυψελιδικά μακροφάγα από BAL

4.1 Ανοσοανίχνευση ισοενζύμων PLA₂

- Εκκρινόμενη φωσφολιπάση A₂ τύπου IIA (sPLA₂ IIA) στα κύτταρα

Πραγματοποιήθηκε ανίχνευση της εκκρινόμενης φωσφολιπάσης A₂ τύπου IIA στα κυψελιδικά μακροφάγα με τη μέθοδο της ανοσοαποτύπωσης. Η ισοφόρτωση των δειγμάτων επιβεβαιώθηκε με προσδιορισμό πρωτεΐνης και ανίχνευση ακτίνης. Παρατηρήθηκε παραγωγή της εκκρινόμενης φωσφολιπάσης A₂ τύπου IIA μόνο στα δείγματα που είχαν ενεργοποιηθεί με LPS, ενώ δεν παρατηρήθηκαν διαφορές μεταξύ των δειγμάτων LPS και LPS+stretch (**Γράφημα 3**). Η εικόνα είναι παρόμοια για όλες τις χρονικές διάρκειες του stretch (30 min, 1 h, 4 h και 24 h).



Γράφημα 3. Ανίχνευση επιπέδων εκκρινόμενης PLA₂ IIA σε κυψελιδικά μακροφάγα. Η ισοφόρτωση των δειγμάτων επιβεβαιώθηκε με ανίχνευση ακτίνης. Η επανάληψη των πειραμάτων πραγματοποιήθηκε 3 φορές με παρόμοια αποτελέσματα.

- **Εκκρινόμενη φωσφολιπάση A_2 τύπου IIA ($sPLA_2$ IIA) στα υπερκείμενα των κυττάρων**

Ακολούθησε ανίχνευση της εκκρινόμενης φωσφολιπάσης A_2 τύπου IIA στα υπερκείμενα των κυψελιδικών μακροφάγων με τη μέθοδο της ανοσοαποτύπωσης. Παρατηρήθηκε έκκριση της εκκρινόμενης φωσφολιπάσης A_2 τύπου IIA μόνο στα δείγματα που είχαν ενεργοποιηθεί με LPS, ενώ δεν παρατηρήθηκαν διαφορές μεταξύ των δειγμάτων LPS και LPS+stretch (**Γράφημα 4**). Η εικόνα είναι παρόμοια για όλες τις χρονικές διάρκειες του stretch (30 min, 1 h, 4 h και 24 h).



Γράφημα 4. Ανίχνευση επιπέδων εκκρινόμενης PLA_2 IIA σε υπερκείμενα κυψελιδικών μακροφάγων. Η επανάληψη των πειραμάτων πραγματοποιήθηκε 3 φορές με παρόμοια αποτελέσματα.

- **Εκκρινόμενη φωσφολιπάση A_2 τύπου V ($sPLA_2$ V)**

Η εκκρινόμενη φωσφολιπάση A_2 τύπου V δεν ανιχνεύθηκε ούτε στα κύτταρα αλλά ούτε και στα υπερκείμενα των κυψελιδικών μακροφάγων.

- **Εκκρινόμενη φωσφολιπάση A_2 τύπου X ($sPLA_2$ X)**

Η εκκρινόμενη φωσφολιπάση A_2 τύπου X δεν ανιχνεύθηκε ούτε στα κύτταρα αλλά ούτε και στα υπερκείμενα των κυψελιδικών μακροφάγων.

5. Επίδραση LPS και αζιθρομυκίνης σε κύτταρα A549

5.1 Επίπεδα πρωτεΐνης

A. Στο ομογενοποίημα των κυττάρων

Στις πειραματικές μας συνθήκες διαπιστώθηκε ότι το πρωτεϊνικό περιεχόμενο δεν επηρεάζεται από την επώαση των κυττάρων με LPS και/ή αζιθρομυκίνη (**Πίνακας 7**). Επομένως, σε κάθε περίπτωση και υπό την επίδραση του κάθε παράγοντα δεν υπάρχουν στατιστικά σημαντικές μεταβολές.

Πίνακας 7. Πρωτεϊνικό περιεχόμενο σε ομογενοποίημα κυττάρων A549. Τα αποτελέσματα αντιπροσωπεύουν το μέσο όρο (MO) $\pm$ SEM 3 διαφορετικών πειραμάτων. Δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές μεταβολές.

	Control	Αζιθρομυκ. 5μg/ml	Αζιθρομυκ. 20μg/ml	LPS	LPS + Αζιθρομυκ. 5μg/ml	LPS + Αζιθρομυκ. 20μg/ml
Πρωτεΐνη (μg/ml)	592 $\pm$ 21	589 $\pm$ 20	583 $\pm$ 18	564 $\pm$ 21	550 $\pm$ 17	543 $\pm$ 20

B. Στο υπερκείμενο των καλλιιεργειών

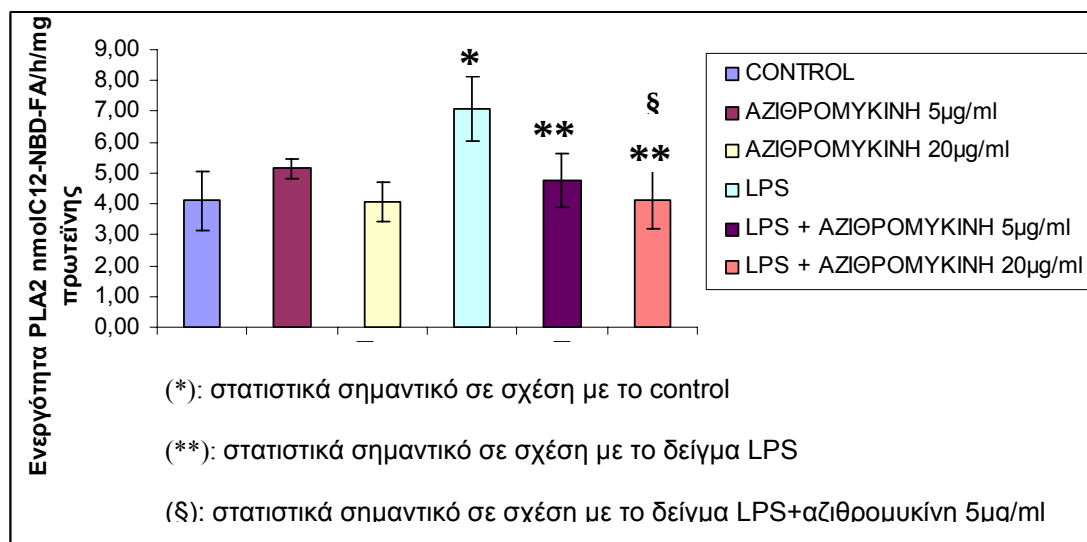
Όσον αφορά τις μετρήσεις του πρωτεϊνικού περιεχομένου στα υπερκείμενα των καλλιιεργειών διαπιστώθηκε ότι επίσης δεν υπάρχουν στατιστικά σημαντικές μεταβολές. Οι πειραματικές τιμές φαίνονται στον **Πίνακα 8**.

Πίνακας 8. Πρωτεΐνη στα υπερκείμενα καλλιιεργειών κυττάρων A549. Τα αποτελέσματα αντιπροσωπεύουν το MO $\pm$ SEM 4 διαφορετικών πειραμάτων. Δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές μεταβολές.

	Control	Αζιθρομυκ. 5μg/ml	Αζιθρομυκ. 20μg/ml	LPS	LPS + Αζιθρομυκ. 5μg/ml	LPS + Αζιθρομυκ. 20μg/ml
Πρωτεΐνη (μg/ml)	256 $\pm$ 18	232 $\pm$ 22	234 $\pm$ 18	248 $\pm$ 20	229 $\pm$ 21	230 $\pm$ 23

5.2 Προσδιορισμός ενεργότητας ολικής PLA₂

Για να μελετηθεί η επίδραση του LPS και της αζιθρομυκίνης στα επίπεδα της PLA₂, πραγματοποιήθηκε αρχικά προσδιορισμός της ενεργότητας του ενζύμου. Η ενεργότητα προσδιορίστηκε φθορισμομετρικά χρησιμοποιώντας C₁₂-NBD-PC ως υπόστρωμα. Η ενεργότητα του ενζύμου βρέθηκε αυξημένη στα δείγματα που είχαν ενεργοποιηθεί με LPS σε σύγκριση με το control (*LPS vs control* : 7.09 ± 1.03 nmol FA/min/mg πρωτεΐνης vs 4.10 ± 0.98 nmol FA/min/mg πρωτεΐνης, $p < 0.05$), ενώ σημαντική μείωση παρατηρήθηκε στα δείγματα που είχαν προ-επωαστεί και με αζιθρομυκίνη και μάλιστα η μείωση είναι δοσο-εξαρτώμενη (*LPS vs LPS+ Αζιθρομυκίνη 5μg/ml* : 4.74 ± 0.87 nmol FA/min/mg πρωτεΐνης vs 7.09 ± 1.03 nmol FA/min/mg πρωτεΐνης, $p < 0.05$ και *LPS vs Αζιθρομυκίνη 20μg/ml*: 4.15 ± 0.94 nmol FA/min/mg πρωτεΐνης vs 7.09 ± 1.03 nmol FA/min/mg πρωτεΐνης, $p < 0.05$) **Γράφημα 5.**

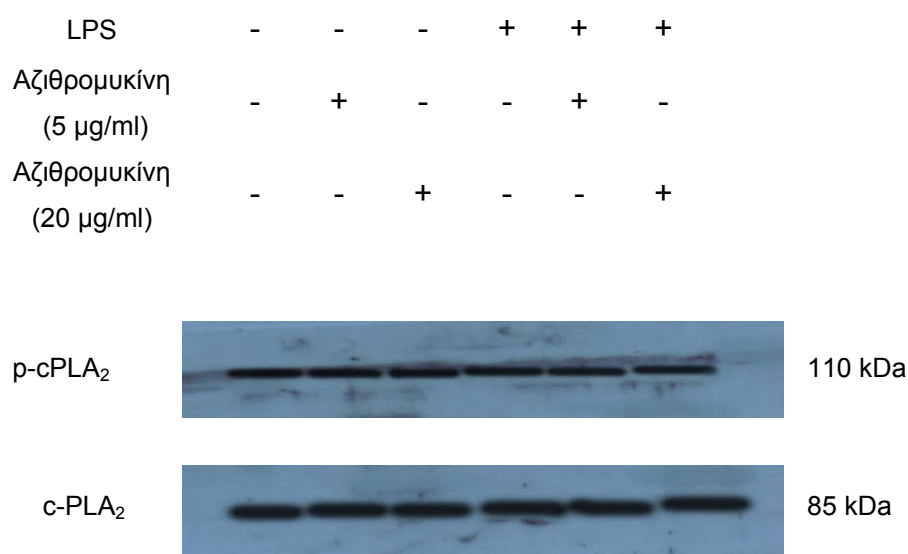


Γράφημα 5. Ενεργότητα ολικής PLA₂ στα κύτταρα A549. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέσοι όροι $\pm$ SD. Οι διαφορές είναι στατιστικά σημαντικές: *LPS vs LPS+αζιθρομυκίνη 5 μg/ml* : 4.74 ± 0.87 nmol FA/min/mg πρωτεΐνης vs 7.09 ± 1.03 nmol FA/min/mg πρωτεΐνης, $p < 0.05$ *LPS vs LPS+αζιθρομυκίνη 20 μg/ml* 4.15 ± 0.94 nmol FA/min/mg πρωτεΐνης vs 7.09 ± 1.03 nmol FA/min/mg πρωτεΐνης, $p < 0.05$. Η επανάληψη των πειραμάτων πραγματοποιήθηκε 3 φορές με παρόμοια αποτελέσματα.

5.3 Ανοσοανίχνευση ισοενζύμων PLA₂

- Κυτοσολική (c-PLA₂) και φωσφορυλιωμένη (p-cPLA₂) φωσφολιπάση A₂ στα κύτταρα A549

Αρχικά πραγματοποιήθηκε ανίχνευση της φωσφορυλιωμένης φωσφολιπάσης A₂ στα κύτταρα A549 με τη μέθοδο της ανοσοαποτύπωσης. Η ισοφόρτωση των δειγμάτων επιβεβαιώθηκε με προσδιορισμό πρωτεΐνης και ανίχνευση κυτοσολικής PLA₂. Παρατηρήθηκε ότι τόσο ο LPS όσο και η αζιθρομυκίνη δεν επιφέρουν καμία μεταβολή στα επίπεδα της p-cPLA₂ (Γράφημα 6).

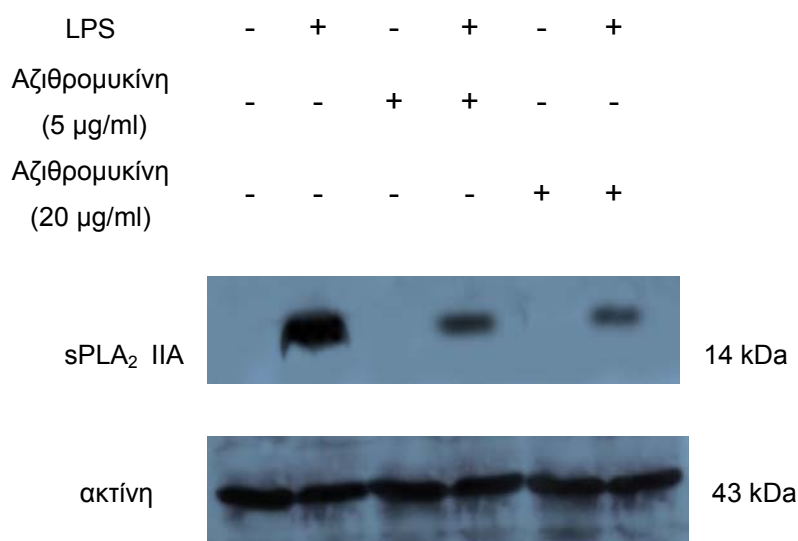


Γράφημα 6. Ανίχνευση επιπέδων φωσφορυλιωμένης PLA₂ σε κύτταρα A549. Η ισοφόρτωση των δειγμάτων επιβεβαιώθηκε με ανίχνευση κυτοσολικής PLA₂. Η επανάληψη των πειραμάτων πραγματοποιήθηκε 3 φορές με παρόμοια αποτελέσματα.

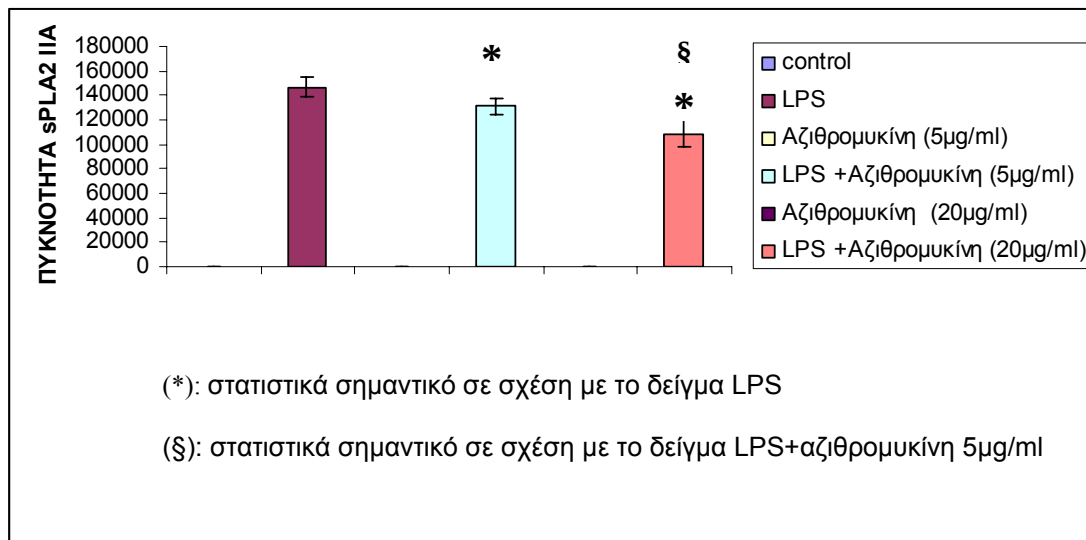
• **Εκκρινόμενη φωσφολιπάση A₂ τύπου IIA (sPLA₂ IIA) στα κύτταρα A549**

Ακολούθησε ανίχνευση της εκκρινόμενης φωσφολιπάσης A₂ τύπου IIA στα κύτταρα A549 με τη μέθοδο της ανοσοαποτύπωσης. Η ισοφόρτωση των δειγμάτων επιβεβαιώθηκε με προσδιορισμό πρωτεΐνης και ανίχνευση ακτίνης. Παρατηρήθηκε παραγωγή της εκκρινόμενης φωσφολιπάσης A₂ τύπου IIA μόνο στα δείγματα που είχαν ενεργοποιηθεί με LPS, ενώ τα δείγματα που είχαν LPS και αζιθρομυκίνη παρουσίασαν σημαντική μείωση της παραγωγής της sPLA₂ IIA, η οποία ήταν και δοσο-εξαρτώμενη (**Γράφημα 7**).

Στη συνέχεια οι περιοχές που αντιστοιχούν στην εκκρινόμενη sPLA₂ IIA υπέστησαν επεξεργασία με ειδικό λογισμικό, και η πυκνότητά αναλύθηκε στατιστικά. Τα αποτελέσματα απεικονίζονται στο **Γράφημα 8**. Όπως φαίνεται και στο γράφημα, τα κύτταρα A549 μετά από ενεργοποίηση με LPS και αζιθρομυκίνη 5μg/ml μειώνουν σημαντικά τα επίπεδα της εκκρινόμενης sPLA₂ IIA σε σύγκριση με τα κύτταρα που είχαν ενεργοποιηθεί μόνο με LPS (131612 ± 6671 vs. 146467 ± 8152 p -value<0.05). Ακόμα μεγαλύτερη είναι η μείωση της παραγωγής της εκκρινόμενης sPLA₂ IIA όταν τα κύτταρα ενεργοποιούνται με LPS και αζιθρομυκίνη 20 μg/ml (108886 ± 10662 vs 146467 ± 8152 p -value<0.05)



Γράφημα 7. Ανίχνευση επιπέδων εκκρινόμενης PLA₂ IIA σε κύτταρα A549. Η ισοφόρτωση των δειγμάτων επιβεβαιώθηκε με ανίχνευση ακτίνης. Η επανάληψη των πειραμάτων πραγματοποιήθηκε 3 φορές με παρόμοια αποτελέσματα.

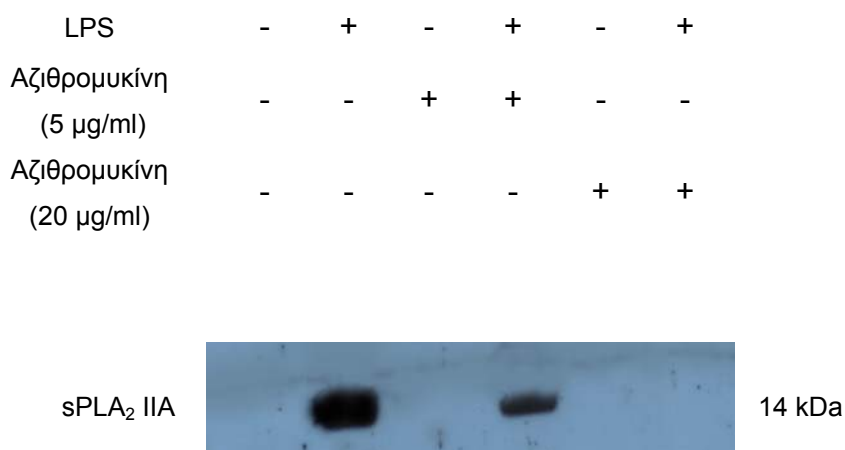


Γράφημα 8. Πυκνότητα της περιοχής που αντιστοιχεί στην sPLA₂ IIA που ανιχνεύθηκε σε κύτταρα A549 μετά από επώαση με LPS, LPS+αζιθρομυκίνη 5µg/ml και LPS+αζιθρομυκίνη 20 µg/ml. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέσοι όροι ± SD. Οι διαφορές είναι στατιστικά σημαντικές: LPS vs LPS+αζιθρομυκίνη 5 µg/ml : 131612 ± 6671 vs. 146467 ± 8152 p -value<0.05, LPS vs LPS+αζιθρομυκίνη 20 µg/ml : 108886 ± 10622 vs 146467 ± 8152 p -value<0.05.

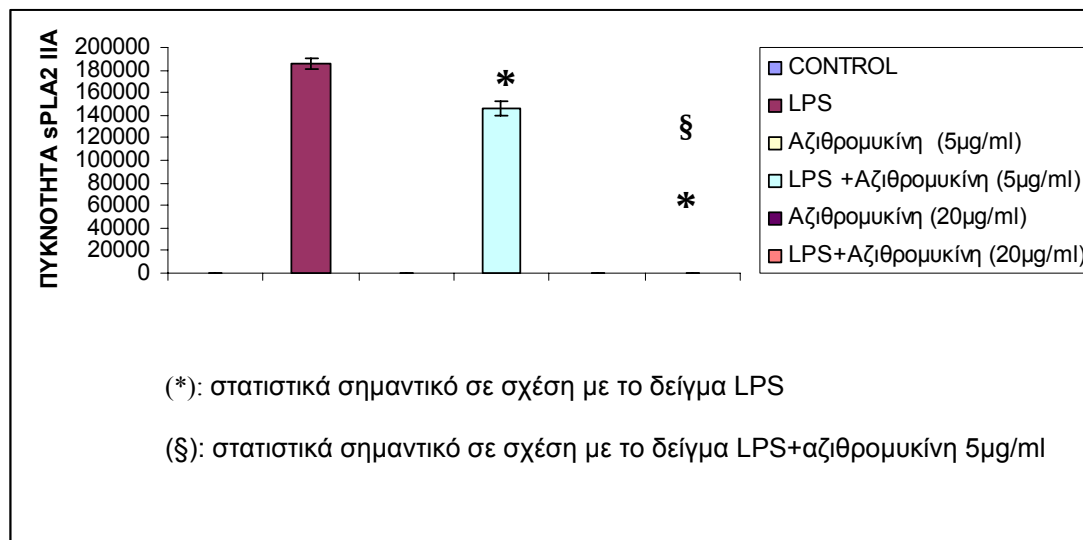
- **Εκκρινόμενη φωσφολιπάση A₂ τύπου IIA (sPLA₂ IIA) στα υπερκείμενα των κυττάρων A549**

Ακολούθησε ανίχνευση της εκκρινόμενης φωσφολιπάσης A₂ τύπου IIA στα υπερκείμενα των κυττάρων A549 με τη μέθοδο της ανοσοαποτύπωσης. Παρατηρήθηκε έκκριση της εκκρινόμενης φωσφολιπάσης A₂ τύπου IIA μόνο στα δείγματα που είχαν ενεργοποιηθεί με LPS, ενώ τα δείγματα που είχαν LPS και αντιβιοτικό παρουσίασαν σημαντική μείωση της έκκρισης της sPLA₂ IIA . Στην περίπτωση του αντιβιοτικού με συγκέντρωση 20 µg/ml η έκκριση σταματά. (Γράφημα 9).

Στη συνέχεια οι περιοχές που αντιστοιχούν στην εκκρινόμενη sPLA₂ IIA υπέστησαν επεξεργασία με ειδικό λογισμικό, και η πυκνότητά αναλύθηκε στατιστικά. Τα αποτελέσματα απεικονίζονται στο **Γράφημα 10**. Όπως φαίνεται και στο γράφημα, τα υπερκείμενα των κυττάρων A549 μετά από ενεργοποίηση με LPS και αζιθρομυκίνη 5μg/ml μειώνουν σημαντικά τα επίπεδα της εκκρινόμενης sPLA₂ IIA σε σύγκριση με τα υπερκείμενα των κυττάρων που είχαν ενεργοποιηθεί μόνο με LPS (145456 ± 6148 vs 185073 ± 4883 $p\text{-value} < 0.05$), ενώ στην περίπτωση που τα κύτταρα είχαν ενεργοποιηθεί με LPS και αζιθρομυκίνη 20 μg/ml η έκκριση σταματά.



Γράφημα 9. Ανίχνευση επιπέδων εκκρινόμενης PLA₂ IIA σε υπερκείμενα κυττάρων A549. Η επανάληψη των πειραμάτων πραγματοποιήθηκε 3 φορές με παρόμοια αποτελέσματα.



Γράφημα 10. Πυκνότητα της περιοχής που αντιστοιχεί στην sPLA₂ IIA που ανιχνεύθηκε σε υπερκείμενα κυττάρων A549 μετά από επώαση με LPS, LPS+αζιθρομυκίνη 5μg/ml και LPS+αντιβιοτικό 20μg/ml . Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέσοι όροι $\pm$ SD. Οι διαφορές είναι στατιστικά σημαντικές: LPS vs LPS+αζιθρομυκίνη 5 μg/ml : 145456 ± 6148 vs 185073 ± 4883 p -value<0.05 και LPS vs LPS+αζιθρομυκίνη 5 μg/ml : 145456 ± 6148 vs 0.00 ± 0.00 p -value<0.05).

- **Εκκρινόμενη φωσφολιπάση A₂ τύπου V (sPLA₂ V)**

Η εκκρινόμενη φωσφολιπάση A₂ τύπου V δεν ανιχνεύθηκε ούτε στα κύτταρα αλλά ούτε και στα υπερκείμενα των κυττάρων A549.

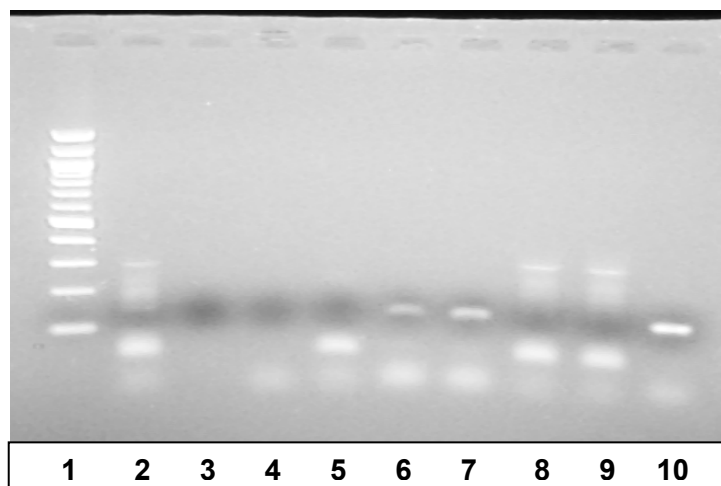
- **Εκκρινόμενη φωσφολιπάση A₂ τύπου X (sPLA₂ X)**

Η εκκρινόμενη φωσφολιπάση A₂ τύπου X δεν ανιχνεύθηκε ούτε στα κύτταρα αλλά ούτε και στα υπερκείμενα των κυττάρων A549.

5.4 Προσδιορισμός έκφρασης του ενζύμου sPLA₂ IIA στα κύτταρα A549

Για τον προσδιορισμό της έκφρασης της sPLA₂ IIA χρησιμοποιήθηκε η τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο. Η μέθοδος περιλαμβάνει αρχικά μετατροπή του RNA των δειγμάτων σε cDNA με τη δράση του ενζύμου ανάστροφη μεταγραφάση. Στη συνέχεια ακολουθεί μετουσίωση του DNA-στόχου, πρόσδεση των εκκινήτων στους κλώνους του DNA-στόχου, και σύνθεση νέων κλώνων DNA από το ένζυμο DNA πολυμεράση. Ως γονίδιο αναφοράς χρησιμοποιήθηκε η GAPDH.

Χρησιμοποιήθηκαν 3 διαφορετικοί primers της sPLA₂ IIA, ωστόσο και με τους 3 παρόλο που χρησιμοποιήθηκε η μέγιστη ποσότητα δείγματος RNA (100 ng), η έκφραση της sPLA₂ IIA ήταν μη ανιχνεύσιμη. Χαρακτηριστικές είναι οι εικόνες που πήραμε από την ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της RT-PCR σε πήκτωμα αγαρόζης 2%. Η **Εικόνα 1** προέκυψε από την ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της RT-PCR που πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας τον primer της Qiagen.

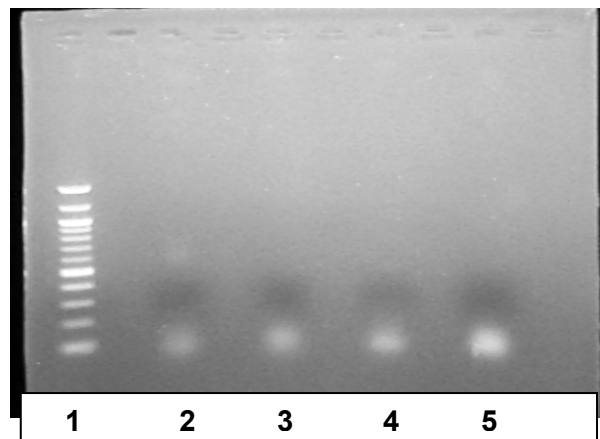


Εικόνα 1. Ηλεκτοφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης προϊόντων RT-PCR που πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας τον primer της Qiagen: **1:** ladder, **2:** χωρίς RNA (PLA2G2A), **3:** δείγμα LPS χωρίς primers (PLA2G2A), **4:** δείγμα LPS χωρίς πολυμεράση (PLA2G2A), **5:** δείγμα LPS χωρίς τρανσκριπτάση (PLA2G2A), **6:** χωρίς RNA (GAPDH), **7:** δείγμα LPS χωρίς τρανσκριπτάση (GAPDH), **8:** δείγμα LPS (PLA2G2A), **9:** δείγμα LPS (PLA2G2A), **10:** δείγμα LPS (GAPDH).

Παρατηρώντας την παραπάνω εικόνα βλέπουμε ότι οι συγκεκριμένοι primers της sPLA₂ IIA προσκολλώνται μη ειδικά με αποτέλεσμα να έχουμε αλληλουχίες

διαφόρων μηκών όπως π.χ. στα 300 bp ως παραπροϊόντα. Αντιθέτως παρατηρούμε ότι στην περίπτωση του γονιδίου αναφοράς (GAPDH) τα προϊόντα της αντίδρασης RT-PCR είναι ξεκάθαρα στα 100 bp περίπου χωρίς παραπροϊόντα. Σημειώνεται ότι οι primers για την GAPDH είναι της ίδιας εταιρείας (Qiagen) και ότι το δείγμα LPS που χρησιμοποιήθηκε ήταν το ίδιο και για τα δύο γονίδια.

Στη συνέχεια χρησιμοποιήθηκαν primers για την sPLA2 IIA που σχεδιάστηκαν από εμάς (**A**) και primers από τη βιβλιογραφία (**B**) [152]. Η **Εικόνα 2** προέκυψε από την ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της RT-PCR που πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας αυτούς τους primers.

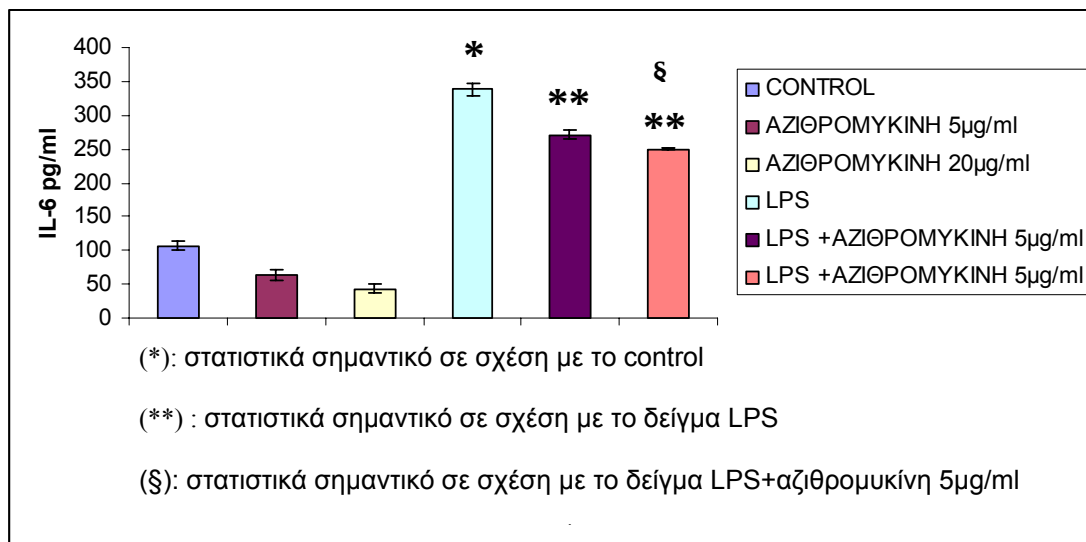


Εικόνα 2. Ηλεκτοφόρηση σε πήκτωμα αгарόζης προϊόντων RT-PCR που πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας τους primer που σχεδιάστηκαν από εμάς (**A**) και από τη βιβλιογραφία (**B**) : **1**: ladder, **2**: δείγμα LPS με primer (**A**) 250 nM, **3**: δείγμα LPS με primer (**A**) 500 nM, **4**: δείγμα LPS με primer (**B**) 250 nM, **5**: δείγμα LPS με primer (**B**) 500 nM.

Παρατηρούμε ότι παίρνουμε κάποιο σήμα στα 100 bp περίπου και καθόλου στα 86 bp που ήταν και το αναμενόμενο. Επομένως, η έκφραση της sPLA2 IIA είναι μη ανιχνεύσιμη, παρόλο που σε επίπεδο πρωτεΐνης η έκφραση του ενζύμου είναι ισχυρή. Το φαινόμενο αυτό θα συζητηθεί στο κεφάλαιο Συμπεράσματα-Συζήτηση.

5.5 Προσδιορισμός IL-6 στα υπερκείμενα των κυττάρων A549

Η IL-6 χρησιμοποιήθηκε ως δείκτης φλεγμονής και προσδιορίστηκε με ποσοτική ανοσοενζυμική τεχνική τύπου sandwich. Τα επίπεδα της IL-6 βρέθηκαν αυξημένα στα δείγματα που είχαν ενεργοποιηθεί με LPS σε σύγκριση με το control (*LPS vs control* : 338.60 ± 9.45 pg/ml vs 106.20 ± 6.51 pg/ml, $p < 0.05$), ενώ σημαντική μείωση παρατηρήθηκε στα δείγματα που είχαν προ-επωαστεί και με αζιθρομυκίνη και μάλιστα η μείωση είναι δοσο-εξαρτώμενη (*LPS vs LPS+ Αζιθρομυκίνη 5μg/ml* : 338.60 ± 9.45 pg/ml vs 271.48 ± 7.41 pg/ml, $p < 0.05$ και *LPS vs Αζιθρομυκίνη 20μg/ml*: 338.60 ± 9.45 pg/ml vs 249.72 ± 1.08 pg/ml, $p < 0.05$)(**Γράφημα 12**).



Γράφημα 12. Επίπεδα IL-6 στα υπερκείμενα των κυττάρων A549. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέσοι όροι $\pm$ SD. Οι διαφορές είναι στατιστικά σημαντικές: *LPS vs LPS+αζιθρομυκίνη 5 μg/ml* : 338.60 ± 9.45 pg/ml vs 271.48 ± 7.41 pg/ml, p -value <0.05 , *LPS vs LPS+αζιθρομυκίνη 20 μg/ml* : 338.60 ± 9.45 pg/ml vs 249.72 ± 1.08 pg/ml, p -value <0.05 .

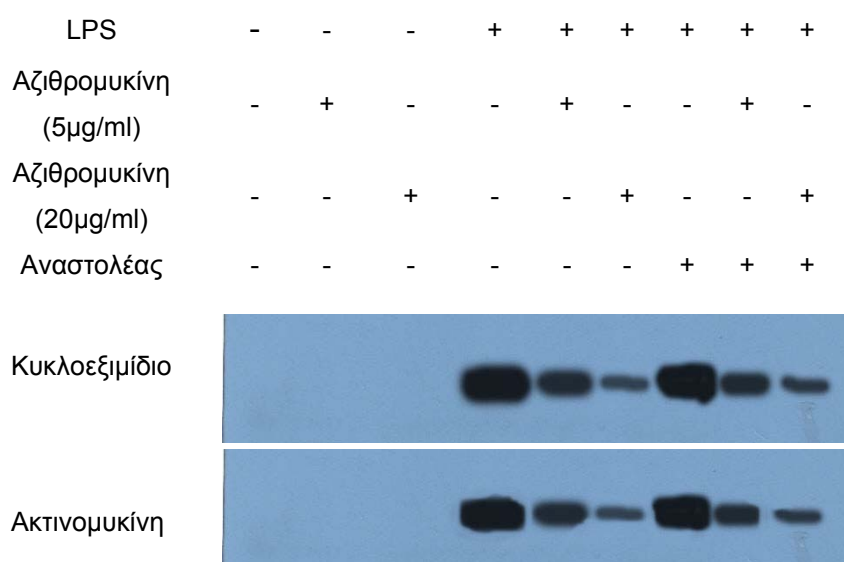
6. Επίδραση των αναστολέων κυκλοεξιμίδιο και ακτινομυκίνη στα κύτταρα A549

Οι καλλιέργειες των κυττάρων A549 που είχαν ενεργοποιηθεί με LPS ή/και αζιθρομυκίνη, επωάστηκαν επίσης με τους αναστολείς κυκλοεξιμίδιο (αναστολέας πρωτεϊνικής σύνθεσης) και ακτινομυκίνη (αναστολέας μεταγραφής), με σκοπό να ελεγχθεί τυχόν δράση του LPS και της αζιθρομυκίνης σε κάποιο από τα παραπάνω στάδια.

6.1 Ανοσοανίχνευση ισοενζύμων PLA₂

- **Εκκρινόμενη φωσφολιπάση A₂ τύπου IIA (sPLA₂ IIA) στα κύτταρα A549**

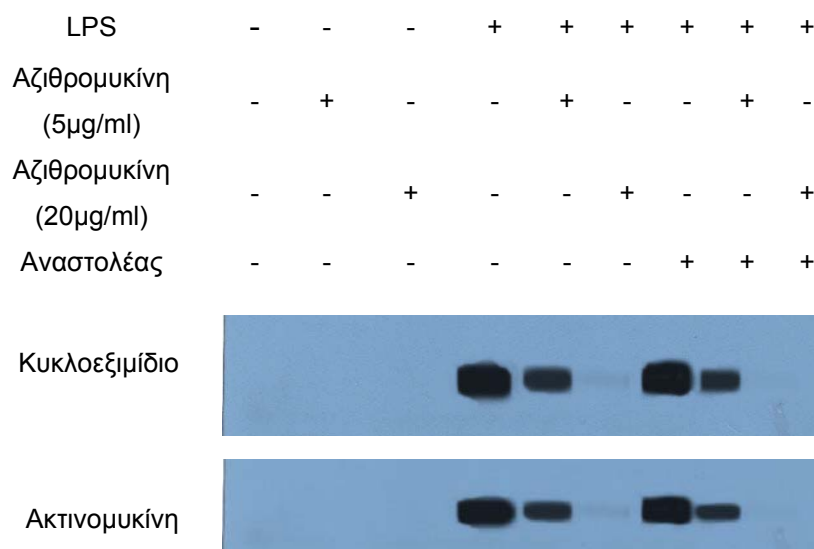
Πραγματοποιήθηκε ανίχνευση της εκκρινόμενης φωσφολιπάσης A₂ τύπου IIA στα κύτταρα A549 με τη μέθοδο της ανοσοαποτύπωσης. Η ισοφόρτωση των δειγμάτων επιβεβαιώθηκε με προσδιορισμό πρωτεΐνης και ανίχνευση ακτίνης. Παρατηρήθηκε ότι τόσο το κυκλοεξιμίδιο όσο και η ακτινομυκίνη δεν είχαν καμία επίδραση στη δράση του LPS και της αζιθρομυκίνης (**Γράφημα 13**).



Γράφημα 13. Ανίχνευση επιπέδων εκκρινόμενης PLA₂ IIA σε κύτταρα A549. Η ισοφόρτωση των δειγμάτων επιβεβαιώθηκε με ανίχνευση ακτίνης. Η επανάληψη των πειραμάτων πραγματοποιήθηκε 3 φορές με παρόμοια αποτελέσματα.

- **Εκκρινόμενη φωσφολιπάση A₂ τύπου IIA (sPLA₂ IIA) στα υπερκείμενα των κυττάρων A549**

Πραγματοποιήθηκε ανίχνευση της εκκρινόμενης φωσφολιπάσης A₂ τύπου IIA στα υπερκείμενα των κυττάρων A549 με τη μέθοδο της ανοσοαποτύπωσης. Η ισοφόρτωση των δειγμάτων επιβεβαιώθηκε με προσδιορισμό πρωτεΐνης. Παρατηρήθηκε ότι τόσο το κυκλοεξιμίδιο όσο και η ακτινομυκίνη δεν είχαν καμία επίδραση στη δράση του LPS και της αζιθρομυκίνης (**Γράφημα 14**).



Γράφημα 14. Ανίχνευση επιπέδων εκκρινόμενης PLA₂ IIA στα υπερκείμενα των κυττάρων A549. Η ισοφόρτωση των δειγμάτων επιβεβαιώθηκε με προσδιορισμό πρωτεΐνης. Η επανάληψη των πειραμάτων πραγματοποιήθηκε 3 φορές με παρόμοια αποτελέσματα.

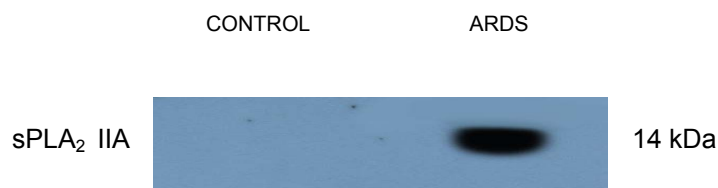
7. Επίδραση LPS και αζιθρομυκίνης σε κυψελιδικά μακροφάγα από BAL

Τα κυψελιδικά μακροφάγα απομονώθηκαν από BAL ασθενών με ή χωρίς ARDS (ομάδα control).

7.1 Ανοσοανίχνευση ισοενζύμων PLA₂

- **Εκκρινόμενη φωσφολιπάση A₂ τύπου IIA (sPLA₂ IIA) στα BALF (Fluid)**

Αρχικά πραγματοποιήθηκε ανίχνευση της εκκρινόμενης φωσφολιπάσης A₂ τύπου IIA στο υπερκείμενο του BAL με τη μέθοδο της ανοσοαποτύπωσης. Η ισοφόρτωση των δειγμάτων επιβεβαιώθηκε με προσδιορισμό πρωτεΐνης. Παρατηρήθηκε έκκριση της εκκρινόμενης φωσφολιπάσης A₂ τύπου IIA μόνο στα BALF από ασθενείς με ARDS (**Γράφημα 15**).



Γράφημα 15. Ανίχνευση επιπέδων εκκρινόμενης PLA₂ IIA σε BALF από ασθενείς με ή χωρίς ARDS. Η ισοφόρτωση των δειγμάτων επιβεβαιώθηκε με προσδιορισμό πρωτεΐνης.

- **Εκκρινόμενη φωσφολιπάση A₂ τύπου IIA (sPLA₂ IIA) στα κυψελιδικά μακροφάγα**

Ακολούθησε ανίχνευση της εκκρινόμενης φωσφολιπάσης A₂ τύπου IIA στα κυψελιδικά μακροφάγα με τη μέθοδο της ανοσοαποτύπωσης. Παρατηρήθηκε παραγωγή της εκκρινόμενης φωσφολιπάσης A₂ τύπου IIA μόνο στα δείγματα που είχαν ενεργοποιηθεί με LPS και μόνο στους ασθενείς CONTROL. Η αζιθρομυκίνη δεν είχε καμία επίδραση (**Γράφημα 16**).

ΑΣΘΕΝΕΙΣ CONTROL

LPS	+	+	-	-
Αζιθρομυκίνη (20μg/ml)	-	+	-	+



ΑΣΘΕΝΕΙΣ ARDS

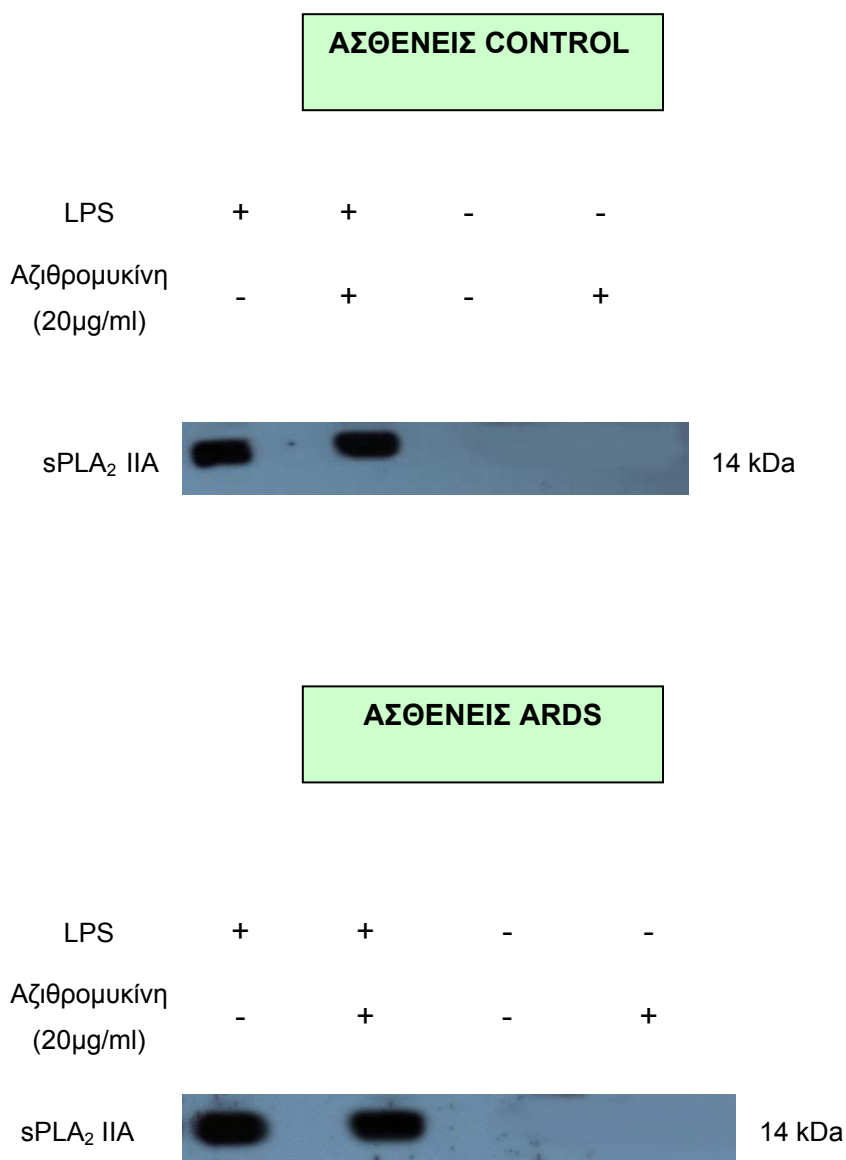
LPS	+	+	-	-
Αζιθρομυκίνη (20μg/ml)	-	+	-	+



Γράφημα 16. Ανίχνευση επιπέδων εκκρινόμενης PLA₂ IIA σε κυψελιδικά μακροφάγα από ασθενείς με ή χωρίς ARDS. Η ισοφόρτωση των δειγμάτων επιβεβαιώθηκε με ανίχνευση ακτίνης.

- **Εκκρινόμενη φωσφολιπάση A_2 τύπου IIA (sPLA₂ IIA) στα υπερκείμενα των κυψελιδικών μακροφάγων**

Ακολούθησε ανίχνευση της εκκρινόμενης φωσφολιπάσης A_2 τύπου IIA στα υπερκείμενα των κυψελιδικών μακροφάγων με τη μέθοδο της ανοσοαποτύπωσης. Παρατηρήθηκε έκκριση της εκκρινόμενης φωσφολιπάσης A_2 τύπου IIA μόνο στα δείγματα που είχαν ενεργοποιηθεί με LPS τόσο στους ασθενείς CONTROL όσο και στους ARDS. Η αζιθρομυκίνη δεν είχε καμία επίδραση (**Γράφημα 17**).



Γράφημα 17. Ανίχνευση επιπέδων εκκρινόμενης PLA₂ IIA στα υπερκείμενα των κυψελιδικών μακροφάγων από ασθενείς με ή χωρίς ARDS. Η ισοφόρτωση των δειγμάτων επιβεβαιώθηκε με προσδιορισμό πρωτεΐνης.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

—

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Επίδραση μηχανικής διάτασης στην παραγωγή και έκκριση της PLA₂ μετά από επίδραση με LPS σε κύτταρα A549 και κυψελιδικά μακροφάγα

Τόσο σε κύτταρα A549 όσο και σε κυψελιδικά μακροφάγα μελετήθηκε η επίδραση της μηχανικής διάτασης και του LPS στην παραγωγή και έκκριση της PLA₂. Τα αποτελέσματα ήταν παρόμοια και για τα δύο είδη κυττάρων. Συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε παραγωγή και έκκριση της sPLA₂ IIA μόνο στα κύτταρα που είχαν ενεργοποιηθεί με LPS ενώ το stretch στις χρονικές στιγμές 30min, 1h, 4h, και 24h δεν προκάλεσε ούτε παραγωγή (κύτταρα) ούτε έκκριση (υπερκείμενα κυττάρων) του ενζύμου. Επίσης, καμία στατιστικά σημαντική μεταβολή δεν παρατηρήθηκε στο πρωτεϊνικό περιεχόμενο των κυττάρων. Ο LPS χρησιμοποιήθηκε ως θετικό control για την παραγωγή και έκκριση της sPLA₂ IIA.

Βιβλιογραφική έρευνα υποδεικνύει την επίδραση του μηχανικού stretch στην παραγωγή διαφόρων φλεγμονωδών παραγόντων. Πρόκειται όμως για περιπτώσεις όπου το stretch που εφαρμόζεται είναι κυκλικό και όχι στατικό όπως στην περίπτωση μας. Συγκεκριμένα, το κυκλικό stretch βρέθηκε να αυξάνει τα επίπεδα της IL-8 καθώς και την έκφρασή της σε κύτταρα A549 [152, 153]. Σε άλλη εργασία παρατηρήθηκε ενεργοποίηση της ERK μετά από κυκλικό stretch σε βρογχικά επιθηλιακά κύτταρα [154], ενώ σε κυψελιδικά μακροφάγα σημειώθηκε αύξηση στην έκκριση TNFα μετά από επίδραση με LPS [155]. Στο δικό μας εργαστήριο σε εργασία της κ. Λέτσιου, ανάλογο στατικό stretch σε κύτταρα A549 βρέθηκε να προκαλεί ενεργοποίηση της cPLA₂ και μάλιστα μέσω του μονοπατιού MAP κινασών (MEK/ERK). Ωστόσο, το στατικό stretch βρέθηκε να μην επηρεάζει την παραγωγή ή την έκκριση της sPLA₂ IIA. Μέχρι στιγμής δεν υπάρχουν στη βιβλιογραφία μελέτες που να αφορούν την επίδραση του stretch στην παραγωγή και έκκριση της sPLA₂ IIA. Λαμβάνοντας υπ' όψιν όμως τις παραπάνω εργασίες παρατηρούμε ότι σημαντικό ρόλο στις επιδράσεις που έχει το stretch στην ενεργοποίηση διαφόρων οδών, διαδραματίζουν τόσο το είδος του stretch που θα εφαρμοστεί (κυκλικό ή στατικό) όσο και το είδος του κυττάρου που θα χρησιμοποιηθεί.

Επίδραση αζιθρομυκίνης στην παραγωγή και έκκριση της PLA₂ μετά από επίδραση με LPS σε κύτταρα A549

Στα κύτταρα A549 μελετήθηκε η επίδραση της αζιθρομυκίνης στην παραγωγή και την έκκριση της sPLA₂ IIA. Χρησιμοποιήθηκαν 2 συγκεντρώσεις αζιθρομυκίνης: 5μg/ml και 20μg/ml ενώ ο LPS ως θετικό control.

Παρατηρήθηκε αυξημένη ενεργότητα ολικής PLA₂ μετά από ενεργοποίηση με LPS, η οποία παρουσίασε σημαντική μείωση με την επίδραση της αζιθρομυκίνης και μάλιστα δόσο-εξαρτώμενη. Η ανοσοανίχνευση των ισοενζύμων PLA₂ ενισχύει την παραπάνω παρατήρηση. Συγκεκριμένα, ο LPS και η αζιθρομυκίνη δεν προκάλεσαν καμία μεταβολή στα επίπεδα της φωσφορυλιωμένης cPLA₂. Αντιθέτως, παρατηρήθηκε παραγωγή της sPLA₂ IIA στα κύτταρα μετά από ενεργοποίηση με LPS, η οποία μειώθηκε σημαντικά μετά από την επίδραση της αζιθρομυκίνης. Η μείωση ήταν δόσο-εξαρτώμενη. Παρόμοια ήταν τα αποτελέσματα και στην περίπτωση των υπερκειμένων των κυττάρων, με τη διαφορά ότι στη μεγάλη συγκέντρωση της αζιθρομυκίνης η έκκριση του ενζύμου σταματά. Η επίδραση των αναστολέων κυκλοοξιμίδιο (αναστολέας πρωτεϊνικής σύνθεσης) και ακτινομυκίνη (αναστολέας μεταγραφής) δεν είχαν καμία επίδραση στη δράση του LPS και της αζιθρομυκίνης. Σε αντίθεση με την περίπτωση της πρωτεΐνης, η έκφραση του ενζύμου sPLA₂ IIA ήταν πολύ χαμηλή έως μηδενική. Τέλος, ο προσδιορισμός της φλεγμονώδους κυτοκίνης IL-6 έδειξε παρόμοια αποτελέσματα με εκείνα της ανοσοανίχνευσης, όπου και πάλι ο LPS φαίνεται να επάγει την παραγωγή της IL-6 ενώ η αζιθρομυκίνη προκαλεί σημαντική μείωση δόσο-εξαρτώμενη.

Όσο αφορά την cPLA₂, ο LPS φάνηκε να μην προκαλεί περαιτέρω ενεργοποίηση της στα κύτταρα A549. Πολλές μελέτες αναφέρουν ότι η cPLA₂ ενεργοποιείται μέσω φωσφορυλίωσης. Το ενεργοποιημένο ένζυμο, στη συνέχεια, μετατοπίζεται στην κυτταρική μεμβράνη όπου και εντοπίζεται το υπόστρωμα (φωσφολιπίδια). Η μετατόπιση αυτή απαιτεί αύξηση του ενδοκυττάριου ελεύθερου Ca²⁺. Αυξημένες ποσότητες αραχιδονικού οξέος ελευθερώνονται όταν τα επίπεδα Ca²⁺ βρίσκονται στο μέγιστο, και αυτό συμβαίνει όταν το ένζυμο βρίσκεται στη μέγιστη ενεργοποίηση. Η προσθήκη LPS στα κύτταρα A549 προφανώς δεν αυξάνει τα επίπεδα της συγκέντρωσης του ενδοκυττάριου Ca²⁺, επομένως μόνο μικρές συγκεντρώσεις ενεργοποιημένης cPLA₂ μπορούν να μετατοπιστούν στις μεμβράνες όπου εντοπίζεται το υπόστρωμα. Επομένως, η απελευθέρωση αραχιδονικού οξέος που επάγεται από το LPS είναι μικρή.

Είναι πλέον γνωστό από τη βιβλιογραφία ότι η ταυτόχρονη συνύπαρξη αυξημένης ενεργότητας sPLA₂ και βιολογικών διεργασιών σε περιοχές με φλεγμονή υποδεικνύουν μια σύνδεση μεταξύ των επιπέδων του ενζύμου και του φλεγμονώδους περιβάλλοντος. Η φλεγμονή συνήθως προκαλεί αύξηση των επιπέδων της sPLA₂ *in vivo*, ενώ η επαγωγή της έκφρασης του ενζύμου πραγματοποιείται σε ένα πλήθος κυτταρικών πληθυσμών μετά από έκθεση σε φλεγμονώδη ερεθίσματα *in vitro* [156]. Η sPLA₂ λαμβάνει μέρος σε φλεγμονώδεις διεργασίες με δύο τρόπους. Επιστρατεύει ελεύθερα λιπαρά οξέα, και κυρίως αραχιδονικό οξύ, δίνοντας με αυτό τον τρόπο το εναρκτήριο σήμα για τη βιοσύνθεση λιπιδικών μεσολαβητών, όπως λευκοτριένια και προσταγλανδίνες. Παράλληλα, λαμβάνει μέρος στη δημιουργία λυσοφωσφολιπιδίων, τα οποία με τη σειρά τους συμβάλλουν στη φλεγμονή [157], επάγει δηλαδή άμεσα την ενεργοποίηση φλεγμονωδών κυττάρων [65]. Αρκετές sPLA₂ προάγουν εξωκύττωση στα ανθρώπινα κυψελιδικά μακροφάγα [158]. Επίσης προάγουν τη βιοσύνθεση κυτοκινών, η οποία είναι ανεξάρτητη της καταλυτικής ενεργότητας του ενζύμου, μιας και δεν έχει βρεθεί σχέση μεταξύ της ικανότητας της sPLA₂ για απελευθέρωση αραχιδονικού οξέος και της παραγωγής κυτοκινών. Επίσης, καταλυτικά ανενεργή sPLA₂ διατηρεί την ικανότητα να προάγει τη βιοσύνθεση κυτοκινών [91]. Η απόκριση των κυττάρων που ενεργοποιούνται από την sPLA₂ περιλαμβάνει την ενεργοποίηση κινασών, ένζυμα τα οποία φωσφορυλιώνουν ενδοκυττάρια πρωτεΐνες και συνεπώς επάγουν διαδικασίες σε επίπεδο πυρηνικό (μεταγραφή), κυτοσολικό (ενεργοποίηση ενζύμων), και μεμβρανικό (εξωκυττάρωση, απελευθέρωση μεσολαβητών). Η sPLA₂ επίσης έχει την ικανότητα να προκαλεί φωσφορυλίωση των MAP κινασών, όπως ERK1/2 και p38 [159], αλλά και ενεργοποίηση του NF-κΒ [160]. Ενδιαφέρον είναι και το γεγονός ότι η αναστολή της cPLA₂ αναστέλλει επίσης την έκφραση της sPLA₂ σε ορισμένα κύτταρα [161].

Όλες οι παραπάνω μελέτες οδηγούν στο συμπέρασμα ότι η sPLA₂ εκτός της καταλυτικής ενεργότητας, χάρη στην οποία μπορεί να παρέχει υποστρώματα για τη βιοσύνθεση λιπιδικών μεσολαβητών, παρουσιάζει και εναλλακτικούς μηχανισμούς δράσης, οι οποίοι σχετίζονται με την ικανότητά της να ενεργοποιεί φλεγμονώδη κύτταρα και να επάγει την παραγωγή φλεγμονωδών μεσολαβητών διαφορετικών των εικοσανοειδών. Αυτές οι επιδράσεις σχετίζονται με την αλληλεπίδραση της sPLA₂ με ειδικούς υποδοχείς που εκφράζονται στα κύτταρα στόχους. Οι υποδοχείς αυτοί είναι δύο κατηγοριών: οι N-type (neural type) [162] και οι M-type (muscular type) [163]. Οι N-type υποδοχείς εκφράζονται σε υψηλά επίπεδα στον εγκέφαλο και κατέχουν τουλάχιστον δύο περιοχές πρόσδεσης επιδεικνύοντας αυξημένη συγγένεια για τις νευροτοξικές sPLA₂s (π.χ. GIA και GIII) και χαμηλή συγγένεια για τις GIB και GIIA [164]. Οι M-type υποδοχείς εκφράζονται κυρίως στους σκελετικούς μυς [165] και σε

ιστούς όπως ο πνεύμονας, το συκώτι, και η καρδιά [166]. Αυτοί οι υποδοχείς αποτελούνται από μία μικρή κυτοπλασματική ουρά πλούσια σε κατάλοιπα τυροσίνης, μία διαμεμβρανική περιοχή και μία μεγάλη εξωκυττάρια περιοχή, και παρουσιάζουν αυξημένη συγγένεια για τις GIB, GIIA, και GX sPLA₂s [167, 168]. Η πρόσδεση των sPLA₂s σε αυτούς τους υποδοχείς οδηγεί σε αυτόματη αναστολή της καταλυτικής τους ενεργότητας [169]. Αυτές οι παρατηρήσεις υποστηρίζουν την υπόθεση ότι οι sPLA₂s μπορεί να έχουν ευρύτερες λειτουργίες ως εξωκυτταριοί μεσολαβητές της φλεγμονής.

Η προσθήκη του μακρολιδίου αζιθρομυκίνη στα κύτταρα A549 επέφερε μείωση τόσο στην παραγωγή όσο και στην έκκριση της sPLA₂. Αυτό το εύρημα θα μπορούσε να συσχετιστεί με τις αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες της αζιθρομυκίνης και των μακρολιδίων γενικότερα. Έρευνες των τελευταίων χρόνων έχουν υποδείξει τέτοιες ιδιότητες για τα μακρολίδια, εκτός των παραδοσιακών αντιμικροβιακών ιδιοτήτων. Το φάσμα της δράσης των μακρολιδίων περιλαμβάνει ρύθμιση της λειτουργίας των λευκοκυττάρων και της παραγωγής φλεγμονωδών μεσολαβητών, έλεγχο της έκκρισης βλέννας, διάλυση της φλεγμονής και ρύθμιση των μηχανισμών άμυνας. Τα μακρολίδια μπορούν να συμβάλλουν στην επιδιόρθωση της λειτουργίας του επιθηλίου βελτιώνοντας τις διακυτταρικές συνδέσεις και τις αντιμικροβιακές λειτουργίες και μειώνοντας την παραγωγή κυτοκινών και βλέννας. Επίσης, μπορούν να βελτιώσουν την ικανότητα φαγοκύτωσης των κυψελιδικών μακροφάγων, μειώνοντας με αυτό τον τρόπο τον αριθμό των φλεγμονωδών κυττάρων στους αεραγωγούς, οδηγώντας έτσι στη διάλυση της φλεγμονής. Πιο συγκεκριμένα, η αζιθρομυκίνη φαίνεται να προκαλεί σημαντική μείωση στην έκκριση του TNFα και την παραγωγή της IL-8 στα επιθηλιακά κύτταρα IB3-1CF [128]. Επίσης, σε κύτταρα A549 που είχαν ενεργοποιηθεί με TNFα, η κλαριθρομυκίνη προκάλεσε αναστολή της δράσης του NF-κΒ [129]. Οι παραπάνω δράσεις συμπληρώνονται και από τη σημαντική μείωση που επέφερε η αζιθρομυκίνη στα επίπεδα της IL-6 στα κύτταρα A549. Για όλους αυτούς τους λόγους τα μακρολίδια χρησιμοποιούνται σήμερα εκτενώς για τη θεραπεία φλεγμονωδών ασθενειών του πνεύμονα, όπως άσθμα, κυστική ίνωση, διάχυτη πανβρογχιολίτιδα και χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια.

Ωστόσο, ο ακριβής μηχανισμός δράσης των μακρολιδίων δεν έχει ακόμα διευκρινιστεί. Το πώς και πού τα μακρολίδια επηρεάζουν αυτό το σύνθετο δίκτυο εξωκυττάρων και ενδοκυττάρων αλληλεπιδράσεων αποτελεί αντικείμενο διαρκούς έρευνας. Όπως είναι γνωστό, οι εκκρινόμενες PLA₂s είναι ένζυμα τα οποία συντίθενται στα ριβοσώματα. Κατά τη διάρκεια της σύνθεσής τους διαπερνούν τη μεμβράνη του αδρού ενδοπλασματικού δικτύου και αφού ολοκληρωθεί η σύνθεση μεταφέρονται στο σύστημα Golgi όπου και τροποποιούνται με τη βοήθεια ειδικών ενζύμων. Στη

συνέχεια εξέρχονται από το σύστημα Golgi με τη μορφή εκκρινόμενων κυστιδίων. Σε πολλά είδη κυττάρων οι μεμβράνες αυτών των κυστιδίων συντήκονται με την κυτταροπλασματική μεμβράνη απελευθερώνοντας στον εξωκυττάριο χώρο το περιεχόμενό τους (εξωκύττωση). Σε άλλα πάλι κύτταρα αυτά τα εκκρινόμενα κυστίδια συντήκονται με άλλα παρόμοια κυστίδια και αποτελούν ενδοκυττάρια reservoirs εκκρινόμενης PLA₂.

Όταν λοιπόν το κύτταρο ενεργοποιηθεί, όπως στη συγκεκριμένη περίπτωση από LPS, η sPLA₂ IIA που είναι αποθηκευμένη στα κυστίδια συσσωρεύεται στην κυτταροπλασματική μεμβράνη προφανώς αλληλεπιδρώντας με πρωτεογλυκάνες θειικής ηπαράνης (heparan sulfate proteoglycans HSPG) ή άλλα ανιονικά συστατικά, και έτσι εκκρίνεται. Η έκκριση μπορεί να διευκολύνεται από τα λυσοφωσφολιπίδια που παράγονται προσωρινά από την ενζυμική δράση της sPLA₂ IIA.

Σε όλη αυτή την πορεία παραγωγής και έκκρισης της sPLA₂ IIA φαίνεται πως η αζιθρομυκίνη έχει κάποια εμπλοκή διότι στα κύτταρα A549 επιφέρει σημαντική μείωση τόσο στη μία όσο και στην άλλη. Όσο αφορά την πρώτη μπορεί να μην έχει να κάνει τόσο με την παραγωγή αυτή καθαυτή αλλά με την ποσότητα της sPLA₂ IIA που υπάρχει στο κύτταρο αποθηκευμένη ως απόθεμα. Μάλιστα η δράση της είναι και δοσο-εξαρτώμενη αφού στη μεγαλύτερη συγκέντρωση παρατηρείται ακόμη μεγαλύτερη μείωση της sPLA₂ IIA εντός κυττάρου. Ίσως η αζιθρομυκίνη να επηρεάζει ένζυμα που εμπλέκονται στην παραγωγή αλλά και στην έκκριση, αφού και στην τελευταία τα αποτελέσματα είναι παρόμοια. Η δε έκκριση επηρεάζεται ακόμα περισσότερο αφού στη μεγαλύτερη συγκέντρωση αζιθρομυκίνης σταματά. Μπορεί να παίζει κάποιο ρόλο στην ενζυμική της δράση με αποτέλεσμα να μη μπορούν να παραχθούν λυσοφωσφολιπίδια, τα οποία ως γνωστό διαταράσσουν τη δομή της κυτταροπλασματικής μεμβράνης και με αυτό τον τρόπο να δυσχεραίνεται η έκκριση του ενζύμου. Το γεγονός ότι οι αναστολείς κυκλοεξιμίδιο και ακτινομυκίνη δεν παρουσίασαν καμία επίδραση στη δράση του LPS και της αζιθρομυκίνης υποδεικνύει ότι η παραγωγή και έκκριση της sPLA₂ IIA δεν εξαρτάται από τη μεταγραφή και την πρωτεϊνική σύνθεση.

Όλες οι παραπάνω επιδράσεις αφορούν την sPLA₂ IIA σε επίπεδο πρωτεΐνης. Όπως αναφέρθηκε και στο κεφάλαιο Αποτελέσματα και με τους 3 διαφορετικούς primers που χρησιμοποιήθηκαν για την αντίδραση RT-PCR, υπήρξε αδυναμία στην ανίχνευση έκφρασης της sPLA₂ IIA. Αυτή είναι μια παρατήρηση που έγινε και από τους Triggiani et al, οι οποίοι ανίχνευαν sPLA₂ IIA σε επίπεδο πρωτεΐνης σε κυψελιδικά μακροφάγα, χωρίς όμως να μετράνε κάποιο σήμα mRNA [152]. Αυτό το εύρημα μπορεί να φαίνεται περίεργο αρχικά αλλά μπορεί να εξηγηθεί εάν σκεφτεί κανείς πως η sPLA₂ IIA είναι μία πρωτεΐνη, η οποία αφού συντεθεί δεν

υπάρχει ελεύθερη στο κυτοσόλιο αλλά αντιθέτως αποθηκεύεται σε κυστίδια. Το γεγονός ότι ανιχνεύεται μεγάλη ποσότητα πρωτεΐνης έχει να κάνει με μία αποδοτική μετάφραση του μηνύματος και όχι με την ποσότητά του. Το συγκεκριμένο mRNA προφανώς έχει πολύ μικρό χρόνο ημιζωής και αποικοδομείται γρήγορα με αποτέλεσμα να καθιστά αδύνατη την ανίχνευσή του.

Επίδραση αζιθρομυκίνης στην παραγωγή και έκκριση της sPLA₂ μετά από επίδραση με LPS σε κυψελιδικά μακροφάγα

Η επίδραση της αζιθρομυκίνης στην παραγωγή και έκκριση της sPLA₂ IIA μελετήθηκε επίσης και στα κυψελιδικά μακροφάγα από BAL ασθενών με ARDS ή όχι (ασθενείς control). Χρησιμοποιήθηκε συγκέντρωση αζιθρομυκίνης 20 µg/ml ενώ ο LPS ως θετικό control.

Στα κυψελιδικά μακροφάγα ασθενών της ομάδας control παρατηρήθηκε παραγωγή της sPLA₂ IIA μόνο μετά από ενεργοποίηση με LPS, ενώ στους ασθενείς με ARDS το ανάλογο σήμα ήταν πολύ ασθενές έως μηδενικό. Και στις δύο ομάδες η αζιθρομυκίνη δεν είχε καμία επίδραση. Όσο αφορά τα υπερκείμενα των κυττάρων, έκκριση της sPLA₂ IIA παρατηρήθηκε και πάλι μόνο μετά από ενεργοποίηση με LPS τόσο στην ομάδα control όσο και στην ομάδα ασθενών με ARDS. Ξανά η αζιθρομυκίνη δεν είχε καμία επίδραση. Επίσης, έκκριση του ενζύμου εντοπίστηκε μόνο στα BALF ασθενών με ARDS.

Η ανοσοανίχνευση ισοενζύμων της sPLA₂ στο BALF, έδειξε ότι οι ασθενείς με ARDS έχουν υψηλότερα επίπεδα sPLA₂ τύπου IIA, σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου. Η sPLA₂ έχει βρεθεί σε φλεγμονώδεις ιστούς πειραματικών μοντέλων μιας πληθώρας φλεγμονωδών νοσημάτων, όπως ρευματοειδή αρθρίτιδα και σήψη [170]. Είναι επίσης γνωστό ότι τα μακροφάγα είναι η κύρια πηγή sPLA₂ IIA και έχει αποδειχθεί από αρκετές μελέτες. Φαίνεται λοιπόν ότι το φλεγμονώδες περιβάλλον ενεργοποιεί τα κυψελιδικά μακροφάγα, αλλά και άλλους κυτταρικούς πληθυσμούς προς σύνθεση και έκκριση της sPLA₂ τύπου IIA.

Τα κυψελιδικά μακροφάγα διαδραματίζουν πρωτεύοντα ρόλο στην άμυνα του πνευμονικού παρεγχύματος και αποτελούν μια ετερογενή κυτταρική οικογένεια με φαγοκυτταρικές και ανοσο-ρυθμιστικές ιδιότητες. Μελέτες έχουν υποδείξει ότι στην φλεγμονή, τα μακροφάγα εισέρχονται σε μια κατάσταση ενεργοποίησης, το κύριο χαρακτηριστικό της οποίας αποτελεί η έκκριση φλεγμονωδών και αντι-φλεγμονωδών μεσολαβητών [171], η δυναμική ισορροπία των οποίων καθορίζει και την εξέλιξη της φλεγμονής.

Ο LPS αποτελεί το κύριο συστατικό της εξωτερικής μεμβράνης των Gram αρνητικών βακτηρίων και είναι ένας από τους πιο ισχυρούς υποκινητές της φλεγμονής [172]. Ο LPS ενεργοποιεί τα μακροφάγα για την παραγωγή φλεγμονωδών κυτοκινών αλλά και την έκκριση άλλων μεσολαβητών της φλεγμονής. Η παραγωγή και έκκριση αυτών των κυτοκινών και μεσολαβητών συνεισφέρει στον αποτελεσματικό έλεγχο της ανάπτυξης και διασποράς των παθογόνων μικρο-οργανισμών. Ωστόσο, η εκτός ελέγχου βιοσύνθεση αυτών, μπορεί να οδηγήσει σε σοβαρές συστημικές επιπλοκές [173].

Το μοντέλο για την σηματοδοτική οδό του LPS υποστηρίζει ότι ο εξειδικευμένος υποδοχέας του αγωνιστή αυτού, είναι ο Toll-Like Receptor-4 (TLR-4). Για να επιτελέσει αποτελεσματικά την λειτουργία του, ο TLR-4 αλληλεπιδρά με δυο διαφορετικές πρωτεΐνες. Η πρώτη είναι ο υποδοχέας CD14, μια γλυκοπρωτεΐνη η οποία βρίσκεται στην επιφάνεια των μακροφάγων, και αφού δημιουργήσει σύμπλοκο με τον LPS, στη συνέχεια αλληλεπιδρά με τον TLR-4. Η δεύτερη πρωτεΐνη είναι η MD-2, η οποία δεν διαθέτει κυτταροπλασματική περιοχή, αλληλεπιδρά όμως με το εξωκυττάριο τμήμα του συμπλόκου LPS/TLR-4 [174]. Από την στιγμή που ενεργοποιηθεί ο TLR-4, το σηματοδοτικό, ενδοκυττάριο μονοπάτι που ακολουθείται μπορεί να είναι διαφορετικό [175]. Στο πρώτο σκέλος, στρατολογείται η πρωτεΐνη MyD88 η οποία ενεργοποιεί διαδοχικά τις IRAK-4, IRAK-1 & -2, TRAF6, οδηγώντας στην φωσφορυλίωση και ενεργοποίηση MAP κινασών, αλλά και στην ενεργοποίηση και μεταφορά του NF-κΒ στον πυρήνα του κυττάρου. Η δεύτερη οδός, είναι ανεξάρτητη του MyD88 και στρατολογεί τις πρωτεΐνες TRIF και TRAM. Το τελικό στάδιο, είναι ωστόσο κοινό: η ενεργοποίηση και μεταφορά του NF-κΒ στον πυρήνα όπου και θα επάγει την μεταγραφή και βιοσύνθεση φλεγμονωδών μεσολαβητών.

Στη συγκεκριμένη μελέτη, η ενεργοποίηση των κυψελιδικών μακροφάγων από ασθενείς control, μετά από προσθήκη LPS, επιδεικνύεται από την αύξηση των επιπέδων της sPLA₂. Οι σηματοδοτικοί μηχανισμοί είναι αντικρουόμενοι. Μελετητές υποστηρίζουν ότι η ενεργοποίηση του ενζύμου οφείλεται σε φωσφορυλιώσεις των MAP κινασών, άλλοι μέσω του TNF-α. Στο τελευταίο μονοπάτι, ο LPS προκαλεί σύνθεση του TNF-α, ο οποίος εκκρίνεται εξωκυττάρια και στην συνέχεια προσδένεται στον ειδικό υποδοχέα και προκαλεί ενδοκυττάριους σηματοδοτικούς μηχανισμούς, οι οποίοι καταλήγουν στην βιοσύνθεση της sPLA₂.

Όσο αφορά τα κυψελιδικά μακροφάγα ασθενών με ARDS, μετά από ενεργοποίηση με LPS δεν παρατηρήθηκε παραγωγή της sPLA₂. Αυτό μπορεί να οφείλεται στην ανοχή των μακροφάγων, που ήδη βρίσκονται σε ένα φλεγμονώδες περιβάλλον, και στην αναισθητοποίηση των παραπάνω σηματοδοτικών οδών ή στην ολοκληρωτική έκκριση του ενζύμου λόγω φλεγμονής.

Σε αντίθεση με τα επιθηλιακά κύτταρα A549, η αζιθρομυκίνη δεν είχε καμία επίδραση στην παραγωγή και έκκριση της sPLA₂ από τα κυψελιδικά μακροφάγα. Τα κύτταρα αυτά, όπως προαναφέρθηκε, αποτελούν την πρώτη γραμμή άμυνας του πνεύμονα. Η επίδραση των μακρολιδίων στα κυψελιδικά μακροφάγα αφορά κυρίως την αύξηση της φαγοκυτταρικής τους ικανότητας. Έχει αποδειχθεί ότι μακρολίδια όπως η αζιθρομυκίνη και η κλαριθρομυκίνη αυξάνουν το *in vitro* ποσοστό της φαγοκύτωσης αποπτωτικών ουδετερόφιλων και επιθηλιακών κυττάρων από τα κυψελιδικά μακροφάγα [176, 177]. Αυτή η επίδραση έχει βρεθεί σε κυψελιδικά μακροφάγα που έχουν απομονωθεί από υγιείς εθελοντές και από ασθενείς με χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια (COPD). Η δράση των μακρολιδίων σε αυτή την περίπτωση πιθανώς να διαμεσολαβείτε, τουλάχιστον κατά ένα μέρος, από υποδοχείς της φωσφατιδυλοσερίνης (PS), διότι αναστέλλεται με την προσθήκη λιποσωμάτων τα οποία δεσμεύονται σε αυτούς τους υποδοχείς [177]. Η επίδραση των μακρολιδίων στα κυψελιδικά μακροφάγα δεν περιορίζεται μόνο στους μηχανισμούς της φαγοκύτωσης αλλά επεκτείνεται και στην παραγωγή φλεγμονωδών και αντιφλεγμονωδών μεσολαβητών. Ωστόσο, αυτό εξαρτάται από το είδος του μακρολιδίου που χρησιμοποιείται κάθε φορά.

Κύρια ευρήματα της διδακτορικής διατριβής

1. Η αζιθρομυκίνη μειώνει την παραγωγή της sPLA₂ IIA που επάγεται από LPS στα κύτταρα A549.
2. Επιπροσθέτως, αναστέλλει την έκκριση του ενζύμου στα κύτταρα A549 και μάλιστα η αναστολή είναι δοσο-εξαρτώμενη.
3. Η sPLA₂ IIA ανιχνεύθηκε στα κυψελιδικά μακροφάγα ασθενών της ομάδας control καθώς και στα υπερκείμενα των κυττάρων που είχαν ενεργοποιηθεί με LPS.
4. Στα κυψελιδικά μακροφάγα ασθενών με ARDS η sPLA₂ IIA δεν ανιχνεύθηκε. Ωστόσο, ολόκληρη η ποσότητα του ενζύμου είχε εκκριθεί.
5. Η αζιθρομυκίνη δεν είχε καμία επίδραση στα κυψελιδικά μακροφάγα σε καμία από τις 2 ομάδες ασθενών.

Παρατηρούμε ότι η αζιθρομυκίνη αποδεικνύει τις αντιφλεγμονώδεις ιδιότητές της στα κύτταρα A549 ενώ δεν έχει καμία επίδραση στα κυψελιδικά μακροφάγα που αποτελούν κύτταρα της άμυνας του οργανισμού.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Σκοπός της μελέτης ήταν η διερεύνηση της επίδρασης της μηχανικής τάσης και της αζιθρομυκίνης στην επαγόμενη παραγωγή και έκκριση της sPLA₂-IIA μετά από επίδραση με LPS. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε η κυτταρική σειρά A549, ως μοντέλο μελέτης των πνευμονοκυττάρων τύπου-II, καθώς και πρωτογενείς καλλιέργειες κυψελιδικών μακροφάγων από ασθενείς με Σύνδρομο Οξείας Αναπνευστικής Δυσχέρειας ή όχι. Συγκεκριμένα πραγματοποιήθηκαν: **1)** Διερεύνηση παραγωγής και έκκρισης της sPLA₂ μετά από επίδραση με LPS, stretch σε διάφορες χρονικές στιγμές (30 min, 1h, 4h και 24h), καθώς και συνδυασμό τους, τόσο στα κύτταρα A549 όσο και στα κυψελιδικά μακροφάγα **2)** Διερεύνηση παραγωγής και έκκρισης της sPLA₂-IIA μετά από επίδραση με LPS, αζιθρομυκίνη (5μg/ml και 20μg/ml), καθώς και συνδυασμό τους, τόσο στα κύτταρα A549 όσο και στα κυψελιδικά μακροφάγα **3)** Διερεύνηση παραγωγής και έκκρισης της sPLA₂-IIA μετά από επίδραση των αναστολέων κυκλοοξειμίδιο (αναστολέας μετάφρασης) και ακτινομυκίνη (αναστολέας μεταγραφής) **4)** Προσδιορισμός έκφρασης της sPLA₂-IIA **5)** Προσδιορισμός IL-6 και **6)** Προσδιορισμός ενεργότητας ολικής PLA₂. Τα ευρήματα της μελέτης συνοψίζονται στα εξής: Το στατικό stretch που εφαρμόστηκε τόσο στα A549 κύτταρα όσο και στα κυψελιδικά μακροφάγα δεν είχε καμία επίδραση στην παραγωγή και έκκριση της sPLA₂-IIA. Στα κύτταρα A549 παρατηρήθηκε αυξημένη ενεργότητα ολικής PLA₂ μετά από ενεργοποίηση με LPS, η οποία παρουσίασε σημαντική μείωση με την επίδραση της αζιθρομυκίνης και μάλιστα δοσο-εξαρτώμενη. Επίσης, η αζιθρομυκίνη προκάλεσε δοσο-εξαρτώμενη μείωση στην παραγωγή και έκκριση της sPLA₂-IIA μετά από ενεργοποίηση με LPS. Οι αναστολείς κυκλοοξειμίδιο και ακτινομυκίνη δεν είχαν καμία επίδραση στη δράση του LPS και της αζιθρομυκίνης. Η έκφραση του ενζύμου sPLA₂-IIA ήταν πολύ χαμηλή έως μηδενική. Τέλος, ο προσδιορισμός της φλεγμονώδους κυτοκίνης IL-6 έδειξε παρόμοια αποτελέσματα με εκείνα της ανοσοανίχνευσης. Στα κυψελιδικά μακροφάγα ασθενών της ομάδας ελέγχου παρατηρήθηκε παραγωγή και έκκριση της sPLA₂-IIA μετά από ενεργοποίηση με LPS, ενώ στους ασθενείς με ARDS παρατηρήθηκε μόνο έκκριση του ενζύμου. Η αζιθρομυκίνη δεν είχε καμία επίδραση. Συμπερασματικά, η αζιθρομυκίνη παρουσιάζει αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες στα επιθηλιακά κύτταρα του πνεύμονα, ενώ δεν επηρεάζει τα κυψελιδικά μακροφάγα. Η παραγωγή και η έκκριση της sPLA₂-IIA που επάγεται από τον LPS δεν εξαρτάται από τη μεταγραφή και την πρωτεϊνική σύνθεση, γεγονός που υποδεικνύει εναλλακτικούς μηχανισμούς ενεργοποίησης.

ΑΓΓΛΙΚΗ ΠΕΡΙΛΗΨΗ

The aim of the study was to investigate the effects of mechanical stretch and azithromycin on LPS-induced production and secretion of sPLA₂-IIA. For this purpose, we used the human alveolar epithelial cell line A549, and primary cultures of alveolar macrophages from patients with or without Acute Respiratory Distress Syndrome. Specifically, we studied: **1)** production and secretion of sPLA₂-IIA after activation with LPS, mechanical stretch (30min, 1h, 4h and 24h) and the combination in A549 cells and alveolar macrophages **2)** production and secretion of sPLA₂-IIA after activation with LPS, azithromycin (5μg/ml and 20μg/ml) and the combination in A549 cells and alveolar macrophages **3)** production and secretion of sPLA₂-IIA after the addition of the inhibitors cycloheximide (inhibitor of protein synthesis) and actinomycin D (inhibitor of transcription) **4)** the expression of sPLA₂-IIA **5)** IL-6 levels and **6)** PLA₂ activity. We found that the static stretch we subjected on A549 cells and alveolar macrophages did not affect the production or the secretion of sPLA₂-IIA. Within the A549 cells, we demonstrated an increase in PLA₂ activity after activation with LPS, which was dose-dependently decreased by azithromycin. Studying the isoforms implicated in this response, we found that LPS-induced production and secretion of sPLA₂-IIA were decreased by azithromycin in a dose-dependent manner. The inhibitors cycloheximide and actinomycin D did not affect the action of either LPS or azithromycin. Expression of the sPLA₂-IIA enzyme was not detected. The observations of IL-6 levels were similar to those for PLA₂ activity. Within the alveolar macrophages from the control group of patients, we demonstrated an increase in sPLA₂-IIA levels after activation with LPS, in controversy with the ARDS group. However, in both groups we observed secretion of the enzyme. Azithromycin had no effect on these cells. Our findings suggest that azithromycin shows anti-inflammatory activity in lung epithelial cells, while it does not affect alveolar macrophages. The LPS-induced production and secretion of sPLA₂-IIA from pneumonocytes does not depend on *de novo* transcription and protein synthesis suggesting alternative mechanisms of activation.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- [1] John B West, MD, PhD. Respiratory Physiology – the essentials. 3rd edition.
- [2] Arthur Guyton, MD and John E Hall, PhD. Human Physiology and Mechanisms of Disease. 6th edition 1997.
- [3] Stanley L Robbins, MD, Ramzi S Cotran, MD. Sec Ed.
- [4] Fishman AP, Elias JA, Fishman JA, Grippi MA, Kaiser LR, Senior RM. Pulmonary diseases and disorders. 3rd edition 1998, McGraw – Hill, USA.
- [5] Kielian, T.L., and F. Blecha. CD14 and other recognition molecules for lipopolysaccharide: a review. Immunopharmacology 1995; 29:187–205.
- [6] Wright SD, Ramos RA, Tobias PS, Ulevitch RJ, Mathison JC. CD14, a receptor for 252 complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein, Science 1990; 24:431– 1433.
- [7] McGinley MD, Narhi LO, Kelley MJ, Davy E, Robinson J, Rohde MF, Wright SD, Lichenstein HS. CD14: physical properties and identification of an exposed site that is protected by lipopolysaccharide, J. Biol. Chem. 1995; 270: 5213–5218.
- [8] Juan TSC, Hailman E, Kelley MJ, Busse LA, Davy E, Empig CJ, Narhi LO, Wright SD, Lichenstein HS. Identification of a lipopolysaccharide binding domain in CD14 between amino acids 57 and 64, J. Biol. Chem. 1995; 270:5219–5224.
- [9] Qureshi ST, Lariviere L, Leveque G, Clermont S, Moore KJ, Gros P and Malo D. Endotoxintolerant mice have mutations in Toll like receptor 4. J. Exp. M 1999; 189: 615–625.
- [10] Poltorak A, Xialong H, Smirnova I, Liu MY, Van Huffel C, Du X, Birdwell D, Alejos E, Silva M, Galanos C, Freudenberg M, Ricciardi-Castagnoli P, Layton B and Beutler B. Defective LPS signalling in C3H/HEJ and C57Bl/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. Science 1998; 282:2085–2088.

- [11] Shimazu R, Akashi S, Ogata H, Nagai Y, Fukudome K, Miyake K and. Kimoto M. MD-2, a molecule that confers lipopolysaccharide responsiveness on Toll-like receptor 4. *J. Exp. M* 1999; 189:1777–1782.
- [12] Osamu Takeuchi, Shizuo Akira. Toll like receptors; their physiological and signal transduction system. *International Immunopharmacology* 2001; 1:625-635.
- [13] Daniel-Issakani S, Spiegel AM, and Strulovici B. Lipopolysaccharide response is linked to the GTP binding protein, Gi2, in the promonocytic cell line U937. *J. Biol. Chem.* 1989; 264:20240–20247.
- [14] Lee WL and Donwey GP. Neutrophil activation and acute lung injury. *Current Opinion in Critical Care* 2001; 7:1-7.
- [15] Davis WB, Fells GA, Sun XT, Gadek JE, Venet A, Crystal RG. Eosinophil – mediated injury to lung parenchymal cells and interstitial matrix. *J Clin Invest* 1984; 74:269-278.
- [16] Donna L. Carden, J. Steven Alexander, Ronald B. George. The pathophysiology of the acute respiratory distress syndrome. *Pathophysiology* 1998; 5:1-13.
- [17] Sujal R. Desai. Acute respiratory Distress Syndrome : Imaging of the Injured Lung. *Clinical Radiology* 2002; 57:8-17.
- [18] Nakos G, Pneumatikos J, Tsangaris H, Tellis K, Lekka M. Protein and phospholipids in BAL from patients with hydrostatic pylmonary idema. *Am J Resp Crit Care Med* 1997; 155:945-951.
- [19] Λαχανά Α. Σύνδρομο οξείας αναπνευστικής δυσχάρειας : ταξινόμηση και παθογένεση. Στη Σύγχρονη Ιατρική της Εντατικής Θεραπείας. ARDS. Εκδ. Νάκος Γ., Ιωάννινα 1998; 3:11-19.
- [20] Ettore Crimi, Arthur S. Slutsky. Inflammation and the acute respiratory distress syndrome. *Best Practice & Research Clinical Anaesthesiology* 2004; Vol 18, No 3: 477-492.

- [21] Taylor AE, Garr KAJ. Estimation of equivalent pore radii of pulmonary and alveolar membranes. *Am J Physiol* 1970; 218:1133-1140
- [22] Schneeberger EE, Karnovsky MJ. Substructure of intercellular junctions in freeze-fractured alveolar-capillary membranes of mouse. *Lung. Circ Res* 1976; 38:404-414.
- [23] Lorraine B. Ware, Michael A. Matthay. The Acute Respiratory Distress Syndrome. Review Articles, *The New Journal of Medicine* 2000; Vol 342 No 18:1334-1349.
- [24] Pugin J, Verghese G, Widmer M-C, Matthay MA. The alveolar space is the site of intense inflammatory and profibrotic reactions in the early phase of acute respiratory distress syndrome. *Crit Care Med* 1999; 27:304-12.
- [25] Matthay MA, Wiener-Kronish JP. Intact epithelial barrier function is critical for the resolution of alveolar edema in humans. *Am Rev Respir Dis* 1990; 142:1250-7.
- [26] Kurahashi K, Kajikawa O, Sawa T, et al. Pathogenesis of septic shock in *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. *J Clin Invest* 1999; 104:743-50.
- [27] Cirino G. Multiple controls in inflammation. *Biochem Pharmacol* 1998; 55:105-111.
- [28] Martin WJ, Gadek JE, Hunninghake GW, Crystal RG. Oxidant injury of lung parenchymal cells. *J Clin Invest* 1981; 68:1277-1288.
- [29] Pittet JF, Mackersie RC, Martin TR, Matthay MA. Biological markers of acute lung injury: prognostic and pathogenic significance. *Am J Respir Crit Care Med* 1997; 155:1187-1205.
- [30] Pilewski JM, Albelda SM. Adhesion molecules in the lung. An overview. *Am Rev Respir Dis* 1993; 148:531-537.

- [31] Weiland JE, Davis WB, Holter JF, Mohammed JR, Dorinsky PM, Gadek JE. Lung neutrophils in the adult respiratory distress syndrome. Clinical and pathophysiologic significance. *Am Rev Respir Dis* 1986; 133:218-225.
- [32] Bachofen M, Weibel ER. Alterations of the gas exchange apparatus in adult respiratory insufficiency associated with septicemia. *Am Rev Respir Dis* 1977; 116:589-615.
- [33] Ward PA, Till GO, Kunkel R, Beauchamp C. Evidence for role of hydroxyl radical in complement and neutrophil-dependent tissue injury. *J Clin Invest* 1983; 72:789-801.
- [34] Johnson KJ, Fantone JC III, Kaplan J, Ward PA. *In vivo* damage of rat lungs by oxygen metabolites. *J Clin Invest* 1981; 67:983-993.
- [35] Zimmerman GA, Renzetti AD, Hill HR. Functional and metabolic activity of granulocytes from patients with adult respiratory distress syndrome. *Am Rev Respir Dis* 1983; 127:290-300.
- [36] RM Tate, JE Repine. Neutrophils and the adult respiratory distress syndrome. *Am Rev Respir Dis* 1991; 144:251-252.
- [37] McGovan SE, Stone PJ, Snider GL, Franzblau C. Alveolar macrophages modulation of proteolysis by neutrophil elastase in extracellular matrix. *Am Rev Respir Dis* 1984; 130:734-739.
- [38] Donnelly SC, Haslett C, Reid PT et al. Regulatory role for macrophage migration inhibitory factor in acute respiratory distress syndrome. *Nat Med* 1997; 3:320-3.
- [39] SL Kunkel, RM Strieter. Cytokine networking in lung inflammation. *Hosp. Pract.* 1990; 25:63-76.
- [40] Parson PE, Worthen GS, Moore EE, Tate RM, Henson PM. The association of circulating endotoxin with the development of the adult respiratory distress syndrome. *Am Ren Respir Dis* 1989; 140:294-301.

- [41] Brigham KL, Meyrick B. Endotoxin and lung injury. *Am Rev Respir Dis* 1986; 133:913-927.
- [42] Fowler AA, Hyers TM, Fisher BJ, Bechard DE, Centor RM, Ebster RO. The adult respiratory distress syndrome. Cell populations and soluble mediators in the air spaces of patients at high risk. *Am Rev Dis* 1987; 136:1225-1231.
- [43] Pugin J, Ricou B, Steiberg KP, Suter PM, Martin TR. Proinflammatory activity in bronchoalveolar lavage fluids from patients with ARDS, a prominent role for interleukin-I. *Am J Respir Crit Care Med* 1996; 153:1850-6.
- [44] Duchateau J, Haas M, Schreyen H, Radoux L, Sprangers I, Noel FX, Braun M, Lamy M. Complement activation in patients at risk of developing the adult respiratory distress syndrome. *Am Rev Respir Dis* 1984; 130:1058-1064.
- [45] Rinaldo JE, Christman JW. Mechanisms and mediators of the adult respiratory distress syndrome. *Clin Chest Med* 1990; 11:621-632.
- [46] Μπατιστάτου Α., Καναβάρος Π. Πνευμονικές βλάβες που σχετίζονται/ προκαλούνται από αναπνευστήρα (VALI/VILI). Ιστολογική εικόνα-παθογενετικοί μηχανισμοί. *Σύγχρονη Ιατρική της Εντατικής Θεραπείας*, 2004, Τόμος 7:55-62.
- [47] West J.B. *Respiratory Physiology. The essentials*. 5th ed., Μετάφραση Μπεχράκης Π.Κ., Επιστημονικές Εκδόσεις Γρ. Παρισιάνου.
- [48] Σπυρόπουλος Κ.Β. Πνευμονολογία (Παθοφυσιολογία των αναπνευστικών νόσων), Ιατρικές Εκδόσεις Π.Χ. Πασχαλίδης, 1996, σελ. 172.
- [49] Λέκκα Μ.Ε., Καρκαμπούνας Α., Κητσιούλη Ε. Επιφανειακή τάση και επιφανειοδραστικές ουσίες. *Σύγχρονη Ιατρική της Εντατικής Θεραπείας*, 2002, Τόμος 6:1-10.
- [50] Λέκκα Μ.Ε., Μασσαλάς Χ.Β. Μεταγωγή μηχανικού σήματος. *Σύγχρονη Ιατρική της Εντατικής Θεραπείας*, 2004, Τόμος 6:29-47.

- [51] Gilbert J.A., Weinhold P.S., Banes A.J., Link G.W., Jones G.L. Strain profiles for circular cell culture plates containing flexible surfaces employed to mechanically deform cells in vitro. *J. Biomech.*, 1994; 27:1169-1177.
- [52] Bishop J.E., Mitchell J.J., Absher P.M., Baldor L., Geller H.A., Woodcock-Mitchell J., Hamblin M.J., Vacek P., Low R.B. Cyclic mechanical deformation stimulates human lung fibroblast proliferation and autocrine growth factor activity. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, 1993; 9:126-133.
- [53] Tschumperlin D.J., Margulies S.S. Equibiaxial deformation-induced injury of alveolar epithelia cells in vitro. *Am. J. Physiol. (Lung Cell. Mol. Physiol.)*, 1998; 275:L1173-L1183.
- [54] Wirtz H.R.W., Dobbs L.G. Calcium mobilization and exocytosis after one mechanical strain of lung epithelial cells. *Science*, 1990; 250:1266-1269.
- [55] Winston F.K., Macarak E.J., Gorfien S.F., Thibault L.E. A system to reproduce and quantify the biomechanical environment of the cell. *J. Appl. Physiol.*, 1989; 67:397-405.
- [56] Lee A.A., Delhaas T., Waldman L.K., MacKenna D.A., Villarreal F.J., McCulloch A.D. An equibiaxial strain system for cultured cells. *Am. J. Physiol. (Cell Physiol. 40)*, 1996; 271:C1400-1408.
- [57] Boitano S., Sanderson M.J., Dirksen E.R. A role for Ca^{2+} -conducting ion channels in mechanically-induced signal transduction of airway epithelial cells. *J. Cell Sci.*, 1994; 107:3037-3044.
- [58] Gutierrez J.A., Gonzalez R.F., Dobbs L.G. Mechanical distension modulates pulmonary alveolar epithelial phenotypic expression in vitro. *Am. J. Physiol.*, 1998; 274:L196-L202.
- [59] Bishop J.E., Mitchell J.J., Absher P.M., Baldor L., Geller H.A., Woodcock-Mitchell J., Hamblinn M.J., Vacek P., Low R.B. Cyclic mechanical deformation stimulates human lung fibroblast proliferation and autocrine growth factor activity. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, 1993; 9:126-133.

- [60] Xu J., Liu M., Tanswell A.K., Post M. Mesenchymal determination of mechanical strain-induced fetal lung cell proliferation. *Am. J. Physiol., (Lung Cell. Mol. Physiol. 19)*, 1998; 275:L540-L550.
- [61] Edwards Y.S. Stretch stimulation: its effects on alveolar type II cell function in the lung. *Comp. Biochem. Physiol. Part A*, 2001; 129:245-260.
- [62] Pugin J., Dunn I., Jolliet P., Tassaux D., Magnenat J-L., Nicod L.P., Chevrolet J.-C. Activation of human macrophages by mechanical ventilation in vitro. *Am. J. Physiol.*, 1998; 275:L1040-L1050.
- [63] Wilton DC and Waite M. In: Vance DE and Vance JE (eds.) *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes* (4th Edn.), Elsevier Science B.V. 2002; 112:291-314.
- [64] Six DA and Dennis EA. The expanding superfamily of phospholipase A₂ enzymes: Classification and characterization. *Biochim Biophys Acta* 2000; 1488:1–19.
- [65] Massimo Triggiani, Francescopaolo Granata, Annunziata Frattini, Gianni Marone. Activation of human inflammatory cells by secreted phospholipases A₂. *Biochim Biophys Acta* 2006; 1761:1289-1300.
- [66] Balsinde J, Balboa MA, Insel PA, Dennis EA. Regulation and inhibition of phospholipase A₂. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1999; 39:175–89.
- [67] Six DA, Dennis EA. The expanding superfamily of phospholipase A₂ enzymes: classification and characterization. *Biochim Biophys Acta* 2000; 1488:1–19.
- [68] Bernatchez PN, Winstead MV, Dennis EA, Sirois MG. VEGF stimulation of endothelial cell PAF synthesis is mediated by group V 14 kDa secretory phospholipase A₂. *Br J Pharmacol* 2001; 134:197–205.
- [69] Gijon MA, Spencer DM, Leslie CC. Recent advances into the regulation of cytosolic phospholipase A₂. *Adv Enzyme Regul* 2000; 40:255–68.

- [70] Clark JD, Lin LL, Kriz RW. A novel arachidonic acidselective cytosolic PLA₂ contains a Ca²⁺-dependent translocation domain withh omology to PKC and GAP. *Cell* 1991; 65:1043–1051.
- [71] Sharp JD, White DL, Chiou XG. Molecular cloning and expression of human Ca²⁺-sensitive cytosolic phospholipase A₂. *J. Biol. Chem.* 1991; 266:14850–14853.
- [72] McNish RW, Peters-Golden M. Redistribution of 5-lipoxygenase and cytosolic phospholipase A₂ to the nuclear fraction upon macrophage activation, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1993; 196: 147–153.
- [73] Lin LL, Wartmann M, Lin AY, Knopf JL, Seth A, Davis RJ. cPLA₂ is phosphorylated and activated by MAP kinase. *Cell* 1993; 72:269–278.
- [74] Valentin E, Lambeau G. Increasing molecular diversity of secreted phospholipases A₂ and their receptors and binding proteins. *Biochim. Biophys. Acta* 2000; 1488:59–70.
- [75] Irwin R. How is the level of free arachidonic acid controlled in mammalian cells? *Biochem J* 1982; 204: 3-16.
- [76] Needleman p, Turk J, Jakschik BA, Morrison AR, Lefkowitz JB. Arachidonic acid metabolism. *Annu Rev Biochem* 1986; 55:69-102.
- [77] Samuelsson B, Dahlen SE, Lindgren J, Rouzer C, Serhan C. Leukotriens and lipoxins: structures, biosynthesis and biological effects. *Science* 1987; 237:1171-1176.
- [78] Ford-Hutchinson A, Gresser M, Young R. 5-lipoxygenase. *Annu Rev Biochem* 1994; 63:383-417.
- [79] B. Samuelsson, Leukotrienes: mediators of hypersensitivity reactions and inflammation, *Science* 1983; 220:568–575.

- [80] Penrose JF, Austen KF, Lam BK. Leukotrienes: biosynthetic pathways, release, and receptor mediated actions with relevance to disease states. In: Gallin JL, Snyderman R (Eds.), *Inflammation: Basic Principles and Clinical Correlates*, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 1999: 361–372.
- [81] DuBois RN, Abramson SB, Crofford L. Cyclooxygenase in biology and disease, *FASEB J.* 1998; 12:1063–1073
- [82] Lewis RA, Soberman RJ, Austen KF. Leukotrienes and other products of the 5 lipoxygenase pathway. Biochemistry and relation to pathobiology in human diseases, *N. Engl. J. Med.* 1990; 323:645–655.
- [83] Clark JD, Schievelle AR, Nalefski EA, Lin LL. Cytosolic phospholipase A₂. *J Lipid Mediators Cell Signal* 1995; 12:83–117.
- [84] De Carvalho MS, McCormack AL, Olson E, Ghomashchi F, Gelb JR, Yates JR. Identification of phosphorylation sites of human 85-kDa cytosolic PLA₂ expressed in insect cells and present in human monocytes. *J Biol Chem* 1996; 270:15259– 67.
- [85] Nemenoff RA, Winitz S, Qiun NX, Van Putten V, Johnson L, Heasley LE. Phosphorylation and activation of a high molecular weight form of phospholipase A₂ p42 microtubule-associated protein kinase and protein kinase C. *J Biol Chem* 1993;268:1960– 4.
- [86] Lin LL, Watermann M, Lin AY, Knopf JL, Seth A, Davis RJ. Cytosolic phospholipase A₂ is phosphorylated and activated by MAP kinase *Cell* 1993; 72:269–78.
- [87] Qui ZH, Leslie CC. Protein kinase C-dependent and independent pathways of MAP kinase activation in macrophages by stimuli that activate phospholipase A₂. *J Biol Chem* 1994; 269:19480–7.
- [88] Leslie CC. Properties and regulation of cytosolic phospholipase A₂. *J Biol Chem* 1997; 272:16709–12.

- [89] M. Triggiani, F. Granata, G. Giannattasio, G. Marone. Secretory phospholipases A₂ in inflammatory and allergic diseases: not just enzymes. *J Allergy Clin. Immunol.* 2005; 116: 1000-1006.
- [90] E. Valentine, G. Lambeau. Increasing molecular diversity of secreted phospholipases A₂ and their receptors and binding proteins. *Biochim. Biophys. Acta.* 2000; 1488: 59-70.
- [91] Triggiani M, Granata F, Oriente A, De Marino V, Gentile M, Calabrese C. Secretory phospholipases A₂ induce β -glucuronidase release and IL-6 production from human lung macrophages. *J Immunol* 2000; 164: 4908-15.
- [92] Silliman CC, Moore EE, Zallen G, Gonzalez R, Johnson JL, Elzi DJ. Presence of the M-type sPLA₂ receptor on neutrophils and its role in elastase release and adhesion. *Am J Physiol Cell Physiol* 2002; 283: C1102-13.
- [93] Triggiani M, Granata F, Balestrieri B, Petraroli A, Scalia G, Del Vecchio L. Secretory phospholipases A₂ activate selective functions in human eosinophils. *J Immunol* 2003; 170: 3279-88.
- [94] Park DW, Kim RJ, Sonn JK, Bang OS, Kang SS. Akt as a mediator of secretory phospholipase A₂ receptor-involved inducible nitric oxide synthase expression. *J Immunol* 2003; 170: 2093-9.
- [95] Jo EJ, Lee HY, Lee YN, Kim JL, Kang HK, Park DW. Group IB secretory phospholipase A₂ stimulates CXC chemokine ligand 8 production via ERK and NF- κ B in human neutrophils. *J Immunol* 2004; 173: 6433-9.
- [96] Kudo I, Murakami M. Phospholipase A₂ enzymes. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 2002; 68-69:3-58.
- [97] Valentin E, Lambeau G. Increasing molecular diversity of secreted phospholipases A₂ and their receptors and binding proteins. *Biochim Biophys Acta* 2000; 1488: 59-70.

- [98] Murakami M, Koduri RS, Enomoto A, Shimbara S, Seki M, Yoshihara K. Distinct arachidonate-releasing functions of mammalian secreted phospholipase A₂s in human embryonic kidney 293 and rat mastocytoma RBL-2H3 cells through heparin sulphate shuttling and external plasma membrane mechanisms. *JBiol Chem* 2001; 276:10083-96.
- [99] Kim YJ, Kim KP, Han SK, Munoz NM, Zhu X, Sano H, et al. Group V phospholipase A₂ induces leukotriene biosynthesis in human neutrophils through the activation of group IVA phospholipase A₂. *J Biol Chem* 2002; 277:36479-88.
- [100] Chilton FH, Averill FJ, Hubbard WC, Fonteh AN, Triggiani M, Liu MC. Antigen induced generation of lyso-phospholipids in human airways. *J Exp Med* 1996; 183:2235-45.
- [101] Graler MH, Goetzl EJ. Lysophospholipids and their G protein-coupled receptors in inflammation and immunity. *Biochim Biophys Acta* 2002; 1582:168-74.
- [102] Murakami, M., Nakatani, Y., Atsumi, G., Inoue, K. and Kudo, I. *Crit. Rev. Immunol.* 1997; 17:225-83.
- [103] Lin LL, Wartmann M, Lin AY, Knopf JL, Seth A, Davis RJ. Cytosolic phospholipase A₂ is phosphorylated and activated by MAP kinases. *Cell* 1993; 72:269– 78.
- [104] Borsch-Haubold AG, Bartoli F, Asselin J, Dudler T, Kramer RM, Apitz-Castro R. Identification of the phosphorylation sites of cytosolic PLA₂ in adonist-stimulated human platelets and HeLa cells. *J Biol Chem* 1998; 273:4449– 58.
- [105] Qiu ZH, Gijon MA, de Carvalho MS, Speneer DM, Leslie CC. The role of calcium and phosphorylation of cytosolic PLA₂ in regulating arachidonic acid release in macrophages. *J Biol Chem* 1998; 273:8203– 11.
- [106] De Carvalho MS, McCormiek AL, Olson E, Ghomaschi F, Gelb MH. Identification of phosphorylation sites of human 85-kDa cytosolic PLA₂ expressed in insect cells and present in human monocytes. *J Biol Chem* 1996; 270:15259– 67.

- [107] Mosior M, Six DA, Dennis EA. Group IV cytosolic PLA₂ binds with high affinity and specificity to phosphatidylinositol 4,5 biphosphate resulting in dramatic increases in activity. *J Biol Chem* 1998; 273:2184 – 91.
- [108] Balboa MA, Balsinde J, Winstead MV, Tischfield JA, Dennis EA. Novel group V phospholipase A₂ involved in arachidonic acid mobilization in murine P388D1 macrophages. *J Biol Chem* 1996; 271:32381– 4.
- [109] Kuwata H, Nakatani Y, Murakami M, Kudo I. Cytosolic PLA₂ is required for cytokineinduced expression of type IIA secretory PLA₂ that mediates optimal COX-1 dependent delayed prostaglandin E₂ generation in rat 3Y1 fibroblasts. *J Biol Chem* 1998; 273:1733– 40.
- [110] Cho W. Structure, function and regulation of group V phospholipase A₂. *Biochim Biophys Acta* 2000; 1488:48– 58
- [111] Channon JY and Leslie CC. A Ca-dependent mechanism for associating a soluble arachidonyl-hydrolysing PLA₂ with membrane in the macrophage cell line RAW 264.7. *J Biol Chem* 1990; 265(10): 5409-5413.
- [112] Qiu ZH and Leslie CC. Protein kinase C dependent and independent pathways of MAP kinase activation in macrophages by stimuli that activate phospholipase A₂. *J Biol Chem* 1994; 269(30): 19480-19487.
- [113] Calabrese C, Triggiani M, Marone G, Mazzearella G. Arachidonic acid metabolism in inflammatory cells of patients with bronchial asthma. *Allergy* 2000; 55 Suppl 61:27-30.
- [114] Wu Y, Singer M, Thouron F, Alaoui-El-Azher M, Touqui L. Effect of surfactant on pulmonary expression of type IIA PLA(2) in an animal model of acute lung injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2002; 282(4):L743-50.
- [115] Kleuser B, Meister A, Sternfeld L, Gercken G. Measurement of phospholipase A₂ and 1- alkylglycerophosphocholine acetyltransferase activities in stimulated alveolar macrophages by HPLC analysis of NBD-labeled ether lipids. *Chem Phys Lipids* 1996; 79:29-37.

- [116] Rosa Maria Giron and Julio Ancochea. Macrolides: Not Just Antibiotics. Arch Bronconeumol. 2008; 44(5):229-32.
- [117] Fernando J Martinez, Jeffrey L Curtis and Richard Albert. Role of macrolide therapy in chronic obstructive pulmonary disease. International Journal of COPD 2008; 3(3): 331-350.
- [118] Yolanda S Lopez-Boado and Bruce K Rubin. Macrolides as immunomodulatory medications for the therapy of chronic lung diseases. Current Opinion in Pharmacology. 2008, 8:286-291.
- [119] Rubin BK, Henke MO. Immunomodulatory activity and effectiveness of macrolides in chronic airway disease. Chest 2004; 125 (Suppl.2):70-8.
- [120] Pasquale TR, Tan JS. Non-antimicrobial effects of antibacterial agents. Clin Infect Dis 2005; 40:127-35.
- [121] Gotfried MH. Macrolides for the treatment of chronic sinusitis, asthma, and COPD. Chest 2004; 125(suppl):52S-60.
- [122] Callard R, George AJ, Stark J. Cytokines, chaos, and complexity. Immunity 1999; 11:507-513.
- [123] Bosnar M, Kelneric Z, Munic V, Erakovic V, Pamham MJ: Cellular uptake and efflux of azithromycin, erythromycin, clarithromycin, telithromycin, and cethromycin. Antimicrob Agents Chemother 2005; 49:2372-2377.
- [124] Hodge S, Hodge G, Brozyna S, Jersmann H, Holmes M, Reynolds PN: Azithromycin increases phagocytosis of apoptotic bronchial epithelial cells by alveolar macrophages. Eur Respir J 2006; 28:486-495.
- [125] Yamayro T, Oishi K, Yoshimine H, Tsuchihashi Y, Matsushima K, Nagatake T: Fourteen-member macrolides promote the phosphatidylserine receptor-dependent phagocytosis of apoptotic neutrophils by alveolar macrophages. Antimicrob Agents Chemother 2003; 47:48-53.

- [126] Hodge S, Hodge G, Scicchitano R, Reynolds PN, Holmes M: Alveolar macrophages from subjects with chronic obstructive pulmonary disease are deficient in their ability to phagocytose apoptotic airway epithelial cells. *Immunol Cell Biol* 2003; 81:289-296.
- [127] Hodge S, Hodge G, Ahern J, Jersmann H, Holmes M, Reynolds PN: Smoking alters alveolar macrophage recognition and phagocytic ability: implications in COPD. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2007; 37:748-755.
- [128] Cigana C, Assael BM, Melotti P: Azithromycin selectively reduces tumor necrosis factor alpha levels in cystic fibrosis airway epithelial cells. *Antimicrob Agents Chemother* 2007; 51:975-981.
- [129] Ichiyama T, Nishikawa M, Yoshitomi T, et al. Clarithromycin inhibits NF- κ B activation in human peripheral blood mononuclear cells and pulmonary epithelial cells. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45:44-47.
- [130] Evangelos J.Giamarellos-Bourboulis. Macrolides beyond the conventional antimicrobials: a class of potent immunomodulators. *International Journal of Antimicrobial Agents* 2008; 31:12-20.
- [131] Mauad T, Dolhnikoff M: Pathologic similarities and differences between asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Curr Opin Pulm Med* 2008; 14:31-38.
- [132] Holgate ST: The airway epithelium is central to the pathogenesis of asthma. *Allergol Int* 2008; 57:1-10.
- [133] Vos JB, Datson NA, Rabe KF, Hiemstra PS: Exploring hostpathogen interactions at the epithelial surface: application of transcriptomics in lung biology. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2007; 292:L367-L377.
- [134] Randell SH, Boucher RC: Effective mucus clearance is essential for respiratory health. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2006; 35:20-28.
- [135] Shimizu T, Shimizu S, Hattori R, Gabazza EC, Majima Y: In vivo and in vitro effects of macrolide antibiotics on mucus secretion in airway epithelial cells. *Am J Respir Crit Care Med* 2003; 168:581-587.

- [136] Kaneko Y, Yanagihara K, Seki M, Kuroki M, Miyazaki Y, Hirakata Y, Mukae H, Tomono K, Kadota J, Kohno S: Clarithromycin inhibits overproduction of muc5ac core protein in murine model of diffuse panbronchiolitis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2003; 285:L847-L853.
- [137] Sperandio V: Novel approaches to bacterial infection therapy by interfering with bacteria-to-bacteria signaling. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2007; 5:271-276.
- [138] Swords WE, Rubin BK: Macrolide antibiotics, bacterial populations and inflammatory airway disease. *Neth J Med* 2003; 61:242-248.
- [139] Imamura Y, Yanagihara K, Mizuta Y, Seki M, Ohno H, Higashiyama Y, Miyazaki Y, Tsukamoto K, Hirakata Y, Tomono K et al.: Azithromycin inhibits MUC5AC production induced by the *Pseudomonas aeruginosa* autoinducer N-(3-Oxododecanoyl) homoserine lactone in NCI-H292 Cells. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48:3457-3461.
- [140] Kim DY, Takeuchi K, Ishinaga H, Kishioka C, Suzuki S, Basbaum C, Majima Y: Roxithromycin suppresses mucin gene expression in epithelial cells. *Pharmacology* 2004; 72:6-11.
- [141] Pradal U, Delmarco A, Morganti M, Cipolli M, Mini E, Cazzola G: Long-term azithromycin in cystic fibrosis: another possible mechanism of action? *J Chemother* 2005; 17:393-400.
- [142] Ge N, Nakamura Y, Nakaya Y, Sone S: Interferon-gamma activates outwardly rectifying chloride channels in the human bronchial epithelial cell line BEAS-2B. *J Med Invest* 2001; 48:97-101.
- [143] Barker PM, Gillie DJ, Schechter MS, Rubin BK: Effect of macrolides on in vivo ion transport across cystic fibrosis nasal epithelium. *Am J Respir Crit Care Med* 2005; 171:868-871.
- [144] Jun Tamaoki. The Effects of Macrolides on Inflammatory Cells. *Chest* 2004; 125:41S-51S.

- [145] Giard D.J., Aaronson S.A., Todaro G.J., Arnstein P., Kersey J.H., Dosik H., Parks W.P. In Vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors. *J. Natl. Cancer Inst.* 1973; 51:1417-1423.
- [146] Gazdar A.F., Linnoila R.I., Kurita Y., Oie H.K., Mulshine J.L., Clark J.C., Whitsett J.A. Peripheral airway cell differentiation in human lung cancer cell lines. *Cancer Res.* 1990; 50(17):5481-5487.
- [147] Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 1976; 72:248-254.
- [148] Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL and Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193: 265-275.
- [149] Kitsioulis E.I., Nakos G., Lekka M.E. Differential determination of phospholipase A₂ and PAF-acetylhydrolase in biological fluids using fluorescent substrates. *J. Lipid Res.*, 1999; 40:2346-2356.
- [150] Clark J. M. Jr., Switzer R.L. Experimental Biology. Sec. Ed. Μετάφραση Γ. & Μ. Παπαδόπουλος, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, σελ. 40-51, Ηράκλειο 1992.
- [151] Staehelin T.H, and Gordon, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 1979; 76 (9): 4350-4354.
- [152] Giorgio Giannattasio, Ying Lai, Francescopaolo Granata, Carine M. Mounier, Laxman Nallan, Rob Oslund, Christina C. Leslie, Gianni Marone, Gerard Lambeau, Michael H. Gelb, Massimo Triggiani. Expression of phospholipase A₂ in primary human lung macrophages. Role of cytosolic phospholipase A₂-a in arachidonic acid release and platelet activating factor synthesis. *Biochim Biophys Acta* 2009; 1771: 92-102.
- [153] Nicholas E. Vlahakis, Mark A. Schroeder, Andrew H. Limper and Rolf D. Hubmayr. Stretch induces cytokine release by alveolar epithelial cells in vitro. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 1999; 277: 167-173.

- [154] Tsuda A, B.K. Stringer, S.M. Mijailovich, R.A Rogers, K. Hamanda and M.L. Grey. Alveolar Cell Stretching in the Presence of Fibrous Particles Induces Interleukin-8 Responses. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1999; 21: 455-462.
- [155] Nicholas E. Vlahakis and Rolf D. Hubmayr. Response of alveolar cells to mechanical stress. *Curr Opin Crit Care* 2003; 9: 2- 8.
- [156] Carol J Lang, Emma K. Barnett, Ian R. Doyle. Stretch and CO₂ modulate the inflammatory response of alveolar macrophages through independent changes in metabolic activity. *Cytokine* 2006; 33: 346-351.
- [157] Kudo I, Murakami M, Phospholipase A₂ enzymes, *Lipid Mediat.* 2002; 68 69:53–58.
- [158] Arbibe L, Koumanov K, Vial D, Rougeot C, Faure G, Havet N, Longacre S, Vargaftig BB, Bereziat G,. Voelker DR, Wolf C, Touqui L. Generation of lyso phospholipids from surfactant in acute lung injury is mediated by type-II phospholipase A₂ and inhibited by a direct surfactant protein A-phospholipase A₂ protein interaction, *J. Clin. Invest.* 1998; 102:1152–1160.
- [159] Granata F., Petraroli A., Boilard E., Bezzine S., Bollinger J., Del Vecchio L., Gelb M.H., Lambeau G., Marone G., Triggiani M., Activation of cytokine production by secreted phospholipase A₂ in human lung macrophages expressing the M-type receptor, *J. Immunol.* 2005; 174:464–474.
- [160] Baek S.H., Lim J.H., Park D.W., Kim S.Y, Lee Y.H., Kim J.R., Kim J.H. Group IIA secretory phospholipase A₂ stimulates inducible nitric oxide synthase expression via ERK and NF-κB in macrophages, *Eur. J. Immunol.* 2001; 31:2709–2717.
- [161] Granata F., Frattini A., Loffredo S., Del Prete A., Sozzani S., Marone G., Triggiani M. Signaling events involved in cytokine and chemokine production induced by secretory phospholipase A₂ in human lung macrophages. *Eur. J. Immunol.* 2006; 36:1938–1950.
- [162] C. Couturier, A. Brouillet, C. Couriaud, K. Koumanov, G. Bereziat, M. Andreani. IL-1β induces type IIA secretory phospholipase A₂ gene in vascular smooth muscle

cells by NFκB and peroxisome proliferator-activated receptor-mediated process. J. Biol. Chem. 1999; 274: 23085-23093.

[163] G.Lambeau, J. Barhanin, H. Schweitz, J. Qar, M. Lazdunski. Identification and properties of very high affinity brain membrane-binding sites for a neurotoxic phospholipase from the taipan venom. J Biol Chem.1989; 264:11503-11510.

[164] G. Lambeau, A. Schmid-Alliana, M. Lazdunski, J. Barhanin, Identification and purification of a very high affinity binding protein for toxic phospholipases A₂ in skeletal muscle, J. Biol. Chem.1990; 265:9526–9532.

[165] E. Valentin, G. Lambeau, Increasing molecular diversity of secreted phospholipases A₂ and their receptors and binding proteins, Biochim. Biophys. Acta 2000; 1488: 59–70.

[166] G. Lambeau, M. Lazdunski, Receptors for a growing family of secreted phospholipases A₂, Trends Pharmacol. Sci. 1999; 20:162–170.

[167] L. Cupillard, R. Mulherkar, N. Gomez, S. Kadam, E. Valentin, Lazdunski, G. Lambeau, Both group IB and group IIA secreted phospholipases A₂ are natural ligands of the mouse 180-kDa M-type receptor, J. Biol. Chem. 1999; 274 7043–7051.

[168] Y. Yokota, K. Higashino, K. Nakano, H. Arita, K. Hanasaki, Identification of group X secretory phospholipase A₂ as a natural ligand for mouse phospholipase A₂ receptor, FEBS Lett. 2000; 478: 187–191.

[169] P. Ancian, G. Lambeau, M. Lazdunski, Multifunctional activity of the extracellular domain of the M-type (180 kDa) membrane receptor for secretory phospholipases A₂, Biochemistry 1995; 34: 13146–13151.

[170] Murakami, M. and Kudo, I. Diversity and regulatory functions of mammalian secretory phospholipase A₂. Adv. Immunol. 2001; 77:163–194.

[171] Goodman RB, Pugin J, Lee JS, Matthay MA. Cytokine-mediated inflammation in acute lung injury, Cytokine & Growth Factor Rev 2003; 14:523–535.

[172] Cohen J. The immunopathogenesis of sepsis. Nature 2002; 420:885–891.

- [173] Ulevitch, R. J., & Tobias, P. S. Receptor-dependent mechanisms of cell stimulation by bacterial endotoxin. *Annu Rev Immunol* 1995; 13:437–457.
- [174] Fujiharaa M, Muroib M, Tanamotob K, Suzukic T, Azumaa H, Ikedaa H. Molecular mechanisms of macrophage activation and deactivation by lipopolysaccharide: roles of the receptor complex. *Pharmacology & Therapeutics* 2003; 100:171– 194.
- [175] Palsson-McDermott E & O'Neill LAJ. Signal transduction by the lipopolysaccharide receptor, Toll-like receptor-4. *Immunology* 2004; 113:153–162.
- [176] Yamaryo T, Oishi K, Yoshimine H, Tsuchihashi Y, Matsushima K, Nagatake T. Fourteen-member macrolides promote the phosphatidylserine receptor-dependent phagocytosis of apoptotic neutrophils by alveolar macrophages. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47:48–53.
- [177] Hodge S, Hodge G, Brozyna S, Jersmann H, Holmes M, Reynolds PN. Azithromycin increases phagocytosis of apoptotic bronchial epithelial cells by alveolar macrophages. *Eur Respir J* 2006; 28:486–95.